

DIE TRANSPLANTATION HÄMOPHETISCHER ZELLEN
AUF TEILKÖRPERBESTRAHLTE
UND MIT ALS VORBEHANDELTE MÄUSE

Hans-Jochem Kolb

1971

AUS DEM INSTITUT FÜR HÄMATOLOGIE
DER GESELLSCHAFT FÜR STRAHLENFORSCHUNG, NEUHERBERG

Direktor: Prof. Dr. W. STICH

DIE TRANSPLANTATION HÄMOPHOETISCHER ZELLEN
AUF TEILKÖRPERBESTRAHLTE
UND MIT ALS VORBEHANDELTE MÄUSE

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfasst und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Hans-Jochem Kolb
aus Hassloch/Pfalz

München 1971

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Priv.-Doz.Dr.S.THIERFELDER
Mitberichterstatter:	Prof.Dr.W.STICH
Dekan:	Prof.Dr.W.SPANN

Tag der mündlichen Prüfung: 19.1.1971



MEINEN ELTERN
IN DANKBARKEIT
GEWIDMET



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41553807_0032

INHALTSVERZEICHNIS

EINLEITUNG

METHODIK

Immunsuppression

Bestrahlung

Spenderzellnachweis

alkalische Leukozytenphosphatase

Chromosomenpräparation und -nachweis

Hauttransplantation

Hämagglutinine

ERGEBNISSE

Xenogenes System

Allogenes System

Semiallogenes System

H₂-kompatibles System

Sekundärkrankheit

Immunologische Reaktionen der Schimären

zelluläre Reaktion

humorale Reaktion

Blutbild

Histologie

DISKUSSION

- I. Faktoren beim Einwachsen des Empfängers
Immunologische Abstossung

Nicht-immunologische Abstossung

- II. Immunologische Reaktionen bei Schimärismus
 - Sekundärkrankheit
 - Hauttoleranz
 - Hämagglutininproduktion
- III. Weisses Blutbild und Histologie

ZUSAMMENFASSUNG

LITERATURVERZEICHNIS

EINLEITUNG

Die Transplantation von Knochenmark unterscheidet sich von der Transplantation anderer Organe dadurch, dass eine Suspension von Zellen und kein kompaktes Organ transplantiert wird und dass das Transplantat immunkompetente Zellen enthält. Aus dem erstgenannten Unterschied ergibt sich, dass die Überlebensfähigkeit des Transplantates stärker von den Bedingungen im Empfänger abhängig ist. Ferner führt die Immunkompetenz des Transplantates zur immunologischen Reaktion gegen den Empfänger und damit zur Sekundärkrankheit.

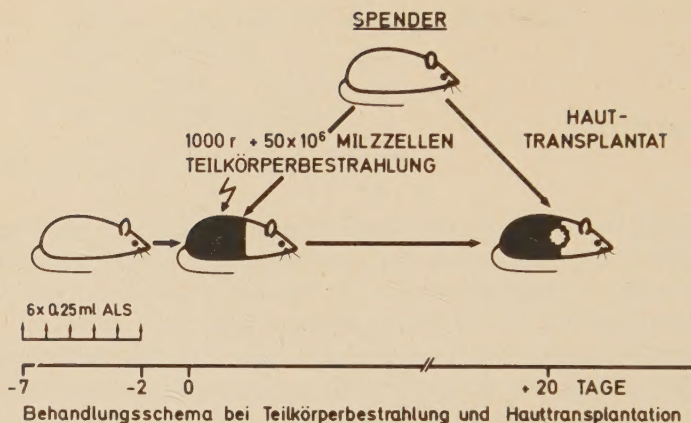
Es stellen sich also bei der Knochenmarktransplantation die Fragen:

Welche Bedingungen müssen im Empfänger geschaffen sein, um ein Überleben der fremden Zellen zu ermöglichen?

Wie kann ich die immunologische Reaktion der transplantierten Zellen gegen den Empfänger verhindern, ohne die Reaktion gegen dritte Antigene, wie zum Beispiel pathogene Keime, völlig auszuschalten?

Die klinische Bedeutung der Knochenmarktransplantation liegt einmal im Ersatz von aplastischem oder fehlerhaft funktionierendem blutbildendem Gewebe. Der Ersatz durch fremdes Knochenmark bietet für eine hochdosierte cytostatische, das Knochenmark zerstörende Therapie von Tumoren die Möglichkeit einer intensiveren Tumorbehandlung. Da es sich bei der Knochenmarktransplantation um eine Verpflanzung immunkompetenter Zellen handelt, besteht weiterhin die Möglichkeit, einerseits eine Transplantationstoleranz gegen andere Spenderorgane zu erzeugen, andererseits Leukämien, Lymphome und andere maligne Tumoren, sofern sie einen Unterschied in den Antigenen ihrer Zelloberflächen besitzen, mit der zellulären Immunität zu bekämpfen.

Die experimentelle Knochenmarktransplantation gelang bisher bei verschiedenen Tierspezies (Nagern, Hunden und Affen) (1). Voraussetzung war eine Vorbehandlung des Empfängers mit supraletaler Bestrahlung.



Der Anlass zu dieser Arbeit war, einen Weg zu finden, fremdes Knochenmark im Empfänger zum Anwachsen zu bringen, ohne beim Empfänger zuerst die risikobelastete Aplasie einer Ganzkörperbestrahlung erzeugen zu müssen. Ich ging davon aus, dass eine supraletale Bestrahlung sowohl stark immunsuppressiv auf den Knochenmarkempfänger wirkt, als auch durch Erzeugung einer Aplasie die räumliche oder funktionelle Voraussetzung zum Überleben fremder Knochenmarkzellen schafft.

Durch die Bestrahlung der hinteren Körperhälfte einschliesslich der Milz verhinderte ich im potentiellen Knochenmarkempfänger eine Aplasie, konnte aber in der bestrahlten Körperhälfte einen von eigenem Knochenmark vorübergehend entleerten Raum für das Anwachsen fremder Zellen erzeugen. Die Immunsuppression des Empfängers - auch in seiner unbestrahlten Körperhälfte - wurde durch eine 6-tägige Vorbehandlung mit Anti-Lymphocyten-Serum erreicht (s. Abb.).

Mit diesem Vorbehandlungsschema für den Knochenmarkempfänger wurden folgende Spender-Empfänger-Kombinationen verschiedener Verwandtschaftsgrade untersucht:

- 1) xenogenes System von Ratte auf Maus
- 2) allogenes System vom Stamm A auf Stamm CBA, sowie die Spezialfälle des allogenen Systems:
von Elterntieren auf die erste Filialgeneration (A auf CBA/A) und zwi-

schen zwei Filialgenerationen, die ein Allel gemeinsam haben, wie z.B. CBL/CBA auf CBA/A; diese Kombination nannten wir semiallogen. Ausserdem wurde zwischen zwei allogenen Stämmen mit gleichem H_2 -Locus transplantiert. (Der H_2 -Locus der Maus kontrolliert die starken Gewebsantigene.)

Das Angehen der Spenderzellen wurde mit cytogenetischen Methoden als direktem und quantitativem Nachweis untersucht; die Sekundärkrankheit wurde durch Ermittlung der Gewichtsabnahme und der Sterblichkeit der transplantierten Tiere gemessen. Die immunologische Reaktion des zellulären Systems wurde mit Hilfe von Hauttransplantaten und des humoralen Systems mit Hilfe von Hämagglutinintitern gegen Hammelerythrocyten festgestellt. Als Anhaltspunkt für das Funktionieren der Hämopoese wurden Leukocyten im peripheren Blut ausgezählt und die weissen Blutbilder differenziert.

Die histologischen Untersuchungen sollten das Ausmass der Sekundärkrankheit und den Funktionszustand der Hämopoese zeigen.

Zu berücksichtigen ist, dass bei Nagern, besonders bei der Maus, die Milz ein wichtiges hämopoetisches Organ darstellt, das während des ganzen Lebens Erythropoese und Granulopoese aufweist, andererseits im Vergleich zum Nagerknochenmark einen hohen Anteil an immunkompetenten Zellen enthält (2). Die Nagermilz ist deswegen dem menschlichen Knochenmark eher vergleichbar als das Nagerknochenmark (3).

METHODIK

Die verwendeten Tierstämme waren:

Ratten: 200 - 250 gr schwere Sprague-Dawley-Ratten beider Geschlechter.
 Mäuse: 10 - 12 Wochen alt; CBA, A, C57BL (= CBL), CBA-T₆ von Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, USA; die ersten Filialgenerationen CBA/A-F₁ und CBL/CBA-F₁ wurden in unserem Tierstall gezüchtet; es wurde immer zwischen gleichgeschlechtlichen Tie-

ren transplantiert.

Knochenmarktransplantationen: die Tiere wurden mit Aether getötet; Femur, Tibia und Humerus präpariert, die Epiphysen der Knochen abgeschnitten und die Diaphysen mit isotoner Kochsalzlösung perfundiert.

Milzzellpräparation: nach Herausnahme der Milz wurde sie mit Pinzette und Schere vorsichtig zerkleinert und in 10 ml isotoner Kochsalzlösung aufgenommen, durch sterile Gaze gefiltert und bei 2000 RPM 10 min. zentrifugiert.

Das Zentrifugat wurde in isotoner Kochsalzlösung aufgenommen und 0,2 - 0,3 ml intravenös gespritzt, es wurden pro Tier 100 Mill. Rattenknochenmarkzellen oder 50 Mill. Mausmilzzellen gegeben. Ab dem Tag der Transplantation wurden die Empfängertiere wöchentlich gewogen.

Vorbehandlung:

1) Antilymphocytenserum

Ich verwendete ein Kaninchen-anti-Maus-Lymphocytenserum, das einen cytotoxischen Titer zwischen 1/500 und 1/2000 aufwies. Die Kaninchen erhielten 10^8 Mausmilzzellen von leukämischen CBL-Tieren.

Immunisierungsschema: nach 3 Wochen wurden die Kaninchen mit derselben Zellzahl geboostert, einige Tage danach entblutet. Die Zellen wurden intravenös ohne Adjuvans gespritzt. Die gewonnenen Seren waren mit Mertiolat versetzt und nicht absorbiert.

2) Bestrahlung

Bei den teilkörperbestrahlten Tieren wurde eine Gesamtdosis von 1000 r auf die hintere Körperhälfte einschliesslich der Milz verabreicht. Die Strahlenquelle war eine Röntgenröhre (Müller MG 300) mit einer Spannung von 300 kV und einem Stromfluss von 4 mA, die Strahlen waren mit einem Kupferfilter von 0,6 mm und einem Aluminiumfilter von 1 mm Dicke gefiltert, um ein homogenes Strahlenspektrum zu erreichen. Die vordere Körperhälfte der Tiere war mit einem Bleiblech von 2 mm Dicke abgedeckt, so dass sie weniger als 60 r abbekam. Damit die Tiere sich nicht bewegten, waren sie mit Evipan narkotisiert und mit Heftpflaster befestigt. Die ganzkörperbestrahlten Tiere wurden mit Ausnahme der Abdeckung gleich behandelt. Der Abstand zwischen Strahlenquelle und Tier betrug 33 cm.

Spenderzellnachweis:

Alkalische Leukocytenphosphatase: das Blut wurde aus dem retroorbitalen venösen Plexus der Maus mit Hämatokritröhrchen entnommen, ausgestrichen, und mit Fast red violet LB Salt und Naphtol AS-BI Phosphoric Acid Sodium Salt der Firma Sigma Chemical Company, St. Louis, Missouri, USA gefärbt.

Chromosomenpräparation (8): Den Tieren wurde 2 Stunden vor Präparation 0,0004 mg/gr Körpergewicht Colcemid (Ciba) intravenös gespritzt. Die Zellen aus Milz und Knochenmark wurden wie oben gewonnen, 10 min mit 800 RPM zentrifugiert, dann in 0,95 %iger Na-Zitrat-Lösung 30 min inkubiert, danach wieder zentrifugiert und mit 1 : 4 Essig-Methanol fixiert. Das fixierte Präparat wurde auf dem Objektträger aufgeblasen und über der Flamme getrocknet, zum Schluss mit Giemsa-Lösung gefärbt. Während das Knochenmark aus Femur und Humerus bei den Tieren der gleichen Gruppe gepoolt wurde, untersuchte ich die Milz bei denselben Tieren einzeln. Die Ergebnisse wurden zusammengefasst, wenn der Prozentsatz an Spenderzellen etwa gleich war.

Das T₆-Chromosom war als besonders kleines Chromosom, meist in der Form von 3 kleinen Punkten zu erkennen (s. Pfeile in der Abb.). Nur Mitosen mit vollständiger Chromosomenzahl wurden bewertet. Insgesamt wurden bis zu 100 Mitosen pro Präparation ausgezählt.

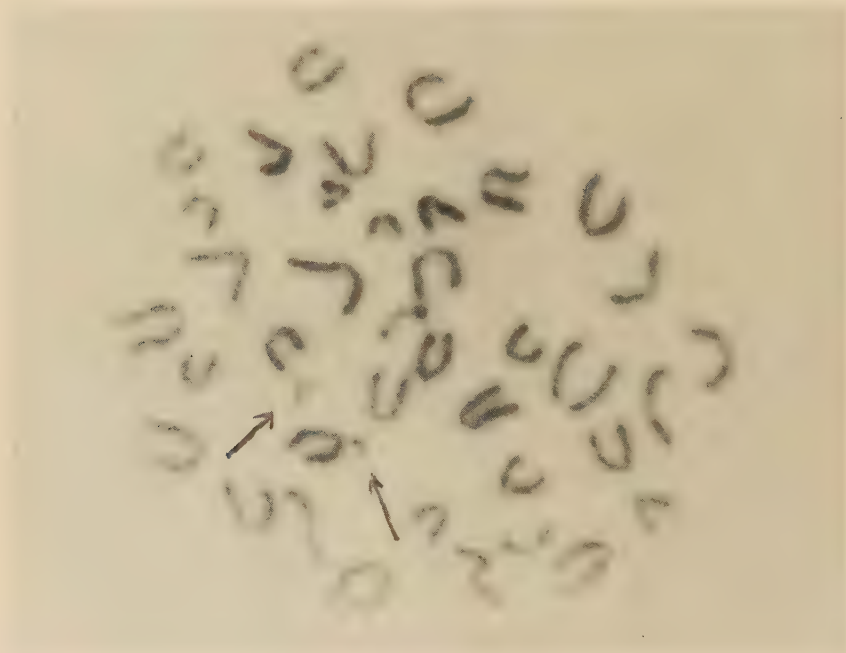
(Abbildung, siehe Seite 12)

Hauttransplantation:

Mit einer Stanze wurden die Hauttransplantate aus der Rückenhaut der Spendertiere gewonnen, das Unterhautfettgewebe mit einer Schere abpräpariert. Bei den Empfängertieren wurde das Unterhautfettgewebe möglichst geschont. Der Durchmesser des Hauttransplantates betrug 12 mm. Beim Empfänger wurden die Hauttransplantate ohne Naht aufgelegt und die Wundränder genau adaptiert, sie wurden mit einem zirkulären Heftpflasterverband versehen. Am 14. Tag wurde der Verband abgenommen und der Zustand der Transplantate hiernach wöchentlich untersucht. Das Transplantat galt als abgestossen, wenn 10 % der ursprünglichen Grösse noch vorhanden war oder die Haut blutunterlaufen war.

Hämagglutinine:

Das Blut aus dem retroorbitalen venösen Plexus der Maus wurde wegen der geringen Menge des gewonnenen Serums von den Tieren der gleichen

Mitose einer CBA-T₆-Maus

Gruppe gepoolt. Das Serum wurde bei 56°C 30 min. inaktiviert und in einer geometrischen Reihe verdünnt, wozu dieselbe Menge einer 2 %igen Hammel- bzw. Rattenerythrocytensuspension gegeben wurde. Die Agglutination wurde unter dem Mikroskop ausgewertet.

Blutbild:

Erythrocyten und Leukocyten wurden in der Zählkammer nach Neubauer ausgezählt, die Differentialblutbilder mit Wright's Stain gefärbt.

Histologie:

Am 8. und 20. Tag wurden 1 - 4 Tiere getötet und Knochenmark in Femur und Humerus, Milz, Leber, Lymphknoten, Thymus, Darm und Lunge histologisch untersucht.

ERGEBNISSE

Bestrahlungskontrolle:

Tiere, deren ganzer Körper mit 1000 r bestrahlt worden war, überlebten im Durchschnitt $10,6 \pm 3,3$ Tage. Sie hatten diese Dosis wie die transplantierten Tiere innerhalb 15 Min. bekommen. Die Strahlen waren Röntgenstrahlen in der oben angegebenen Weise.

Zur immunsuppressiven Wirkung des von uns hergestellten ALS:

Ich verglich dabei 3 Gruppen von Tieren

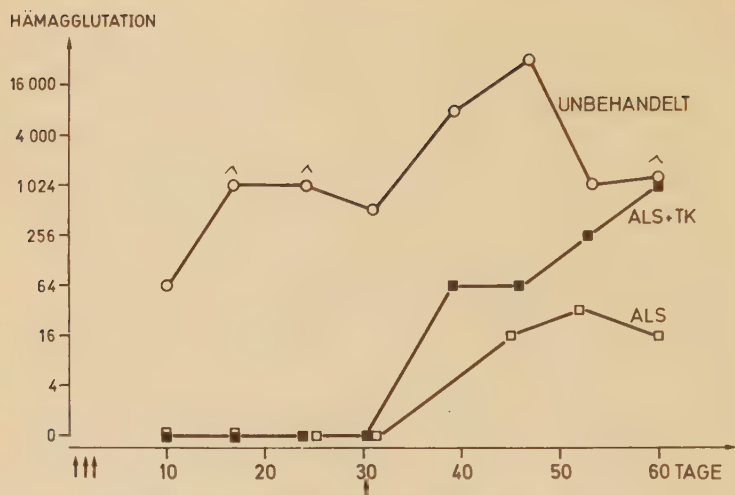
- eine nicht vorbehandelte Gruppe
- eine nur mit ALS 6 Tage lang vorbehandelte und
- eine Gruppe, die nach der ALS-Vorbehandlung teilkörperbestrahlt worden war.

Die Tiere wurden am ersten, zweiten und dritten Tag mit 200 Mill. gewaschenen Rattenerythrocyten immunisiert und die Seren der Tiere innerhalb einer Gruppe gepoolt. Die Hämagglutinine bestimmte ich am 10., 17., 24., 31., 39., 46., 53. und 60.Tag. Am 30.Tag bekamen alle Tiere eine Boosterinjektion mit 200 Mill. gewaschenen Erythrocyten. Während die unvorbehandelten Tiere mit einer Primärantwort mit Titern über 1024 ansprachen, zeigten beide mit ALS behandelten Gruppen keinen Titer. Tiere, die ALS und Teilkörperbestrahlung erhalten hatten, wiesen am 60.Tag einen um 6 Stufen höheren Titer auf als Tiere, die nur mit ALS vorbehandelt waren.

(Abbildung dazu, siehe Seite 14)

XENOGENES SYSTEM

Die einfachste Methode, Spenderzellen von der Ratte in der Empfängermaus nachzuweisen, besteht im Färben der Rattenleukocyten, da diese im Gegensatz zu Mausleukocyten alkalische Phosphatase besitzen. Die einzelnen Gruppen bestanden aus 6 Mäusen (12 Wochen alt, Stamm CBA/A). Nachdem bei der Gruppe, die nach dem oben angegebenen Schema behandelt worden war, am 6., 12. und 20.Tag nach Transplantation keine Rattenleukocyten in der Peripherie auftraten, wurden weitere Gruppen untersucht, die am



Hämagglutinititer nach Sensibilisierung mit Rattenerythrocysten

↑ = 200 Mill. Rattenerythrocysten ○ = unbehandelt ■ = ALS+Teilkörperbestrahlung □ = ALS

2., 3. und 5. Tag nach Ende der ALS-Gabe bestrahlt und transplantiert wurden, ausgehend von der Vorstellung, dass das Kaninchen-anti-Maus-Lymphocyten-Serum auch gegen Rattenzellen wirken und somit ein Einwachsen des Rattenknochenmarks verhindern kann. Auch hier waren keine Rattenleukocyten im Blut der Empfänger zu finden. Eine weitere Gruppe, die statt mit 1000 r mit 1500 r bestrahlt worden war, zeigte ebenfalls keine Spenderleukocyten. Erst bei einer Gruppe, bei der ein Teil eines Hinterbeines ausgeblendet war, traten Rattenleukocyten auf, und zwar 78 % am 7. Tag und 91,5 % am 14. Tag. Jedoch starben die untransplantierten Kontrolltiere, so dass die Bestrahlung als letal anzusehen war.

Bei den ganzkörperbestrahlten Gruppen wurden zwei mit Röntgenstrahlen vorbehandelt, wobei eine statt 1000 r 900 r bekam, zwei weitere mit Strahlen eines Cäsium-Präparates, darunter eine, die statt am Tag der Bestrahlung am darauffolgenden Tag transplantiert wurde. Alle ganzkörperbestrahlten Tiere zeigten keine grossen Unterschiede im Prozentsatz ihrer Fremd-

leukocyten im Blut. Ab dem 12. Tag waren fast nur Rattenleukocyten zu finden, wie in folgender Tabelle zusammengestellt:

Rattenleukocyten in ganzkörperbestrahlten Empfängern: in % der Gesamt-leukocyten

Cs^{137} -Präparat

Bestrahlung mit Cs^{137} -Präparat	Tag 6	Tag 12	Tag 19	Tag 40
1 Tag nach ALS-Behandlung	61,3 $\pm$ 27,7	95,1 $\pm$ 4,5	95,5 $\pm$ 2,0	93,0 $\pm$ 7,7
2 Tage nach ALS-Behandlung	66,0 $\pm$ 24,2	92,6 $\pm$ 5,9	95,5 $\pm$ 3,8	
Röntgenbestrahlung mit Müller MB 300-Gerät	Tag 6	Tag 12	Tag 27	Tag 40
mit 900 r	85,0 $\pm$ 23,8	99,9 $\pm$ 0,8	82,0 $\pm$ 27,7	
mit 1000 r	57,2 $\pm$ 44,8	99,0 $\pm$ 1,0	99,5 $\pm$ 0,7	100

Da mit dieser Methode keine Spenderzellen in den teilkörperbestrahlten Empfängern zu finden waren, untersuchte ich Milz, Femur und Humerus am 3. und 8. Tag auf Mitosen von Rattenknochenmarkzellen. Am 3. Tag waren in der Milz 93,5 %, im Femur 79,5 % und im Humerus 3,6 %, am 8. Tag hingegen nur im Femur noch 2,8 %, in Milz und Humerus keine Spenderzellen mehr. In ganzkörperbestrahlten Empfängern waren am 3. wie am 8. Tag fast nur Rattenzellmitosen zu finden (s. Abb.).

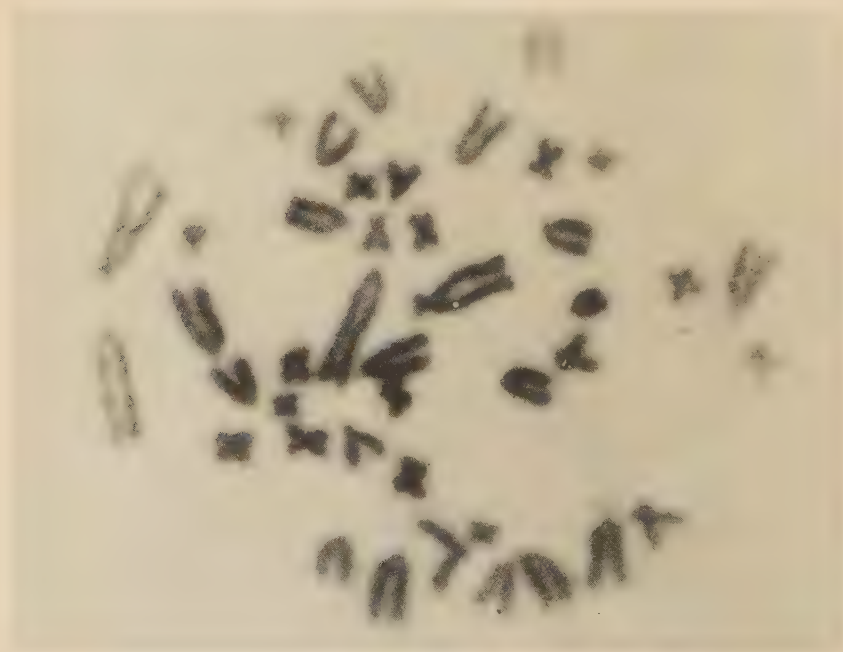
	Tag 3	Tag 8
teilkörperbestrahlten		
Milz	93,5 % (30)	-, - (106)
Femur	79,5 % (39)	2,8 % (36)
Humerus	3,6 % (56)	-, - (114)
ganzkörperbestrahlten		
Milz.	98 % (48)	99,9 % (197)
Femur	96 % (25)	100 % (90)
Humerus	100 % (3)	99 % (100)

Die in Klammern angegebenen Zahlen geben die Gesamtzahl der ausgezählten Mitosen an.

Eines der 30 teilkörperbestrahlten und transplantierten Tiere starb. Von den 23 ganzkörperbestrahlten Tieren starben 15 bis zum 60. Tag. Die mittlere Überlebenszeit der ganzkörperbestrahlten Tiere betrug $24,2 \pm 5,7$ Tage, während die untransplantierten und ganzkörperbestrahlten Kontrolltiere nur bis zum $10,6 \pm 3,3$ Tag lebten. Die nach Ganzkörperbestrahlung transplantierten Tiere zeigten vor ihrem Tode die typischen Symptome einer Sekundärkrankheit wie Diarrhoe, Analekzem, bucklige Haltung und struppiges Haar.

24 teilkörperbestrahlte, transplantierte Tiere hatten zwischen 20. und 25. Tag ein Rattenhauttransplantat erhalten, alle Hauttransplantate waren am 14. Tag nach Hauttransplantation bereits abgestossen.

Mitose von Rattenzellen

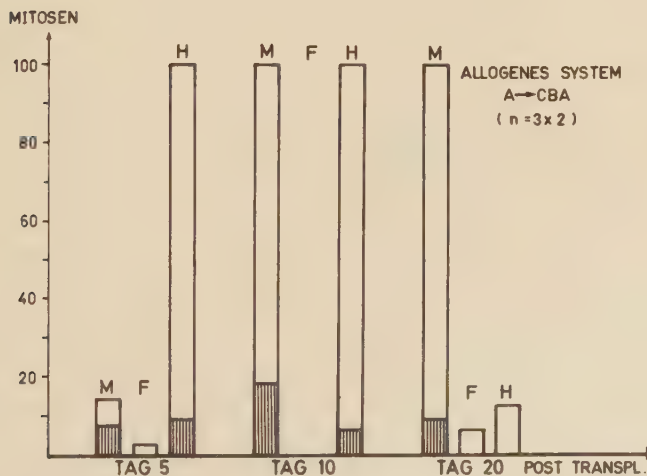


ALLOGENES SYSTEM

Im allogenen System untersuchte ich das Angehen von Spendermilzzellen in drei verschiedenen Kombinationen:

- 1) A auf CBA als stark unverträgliche Kombination, in der Spender und Empfänger sich in beiden H_2 -Allelen unterscheiden. Die Tabelle gibt die Spenderzellzahl in Prozent und die Gesamtzahl der ausgezählten Mitosen in Klammern an:

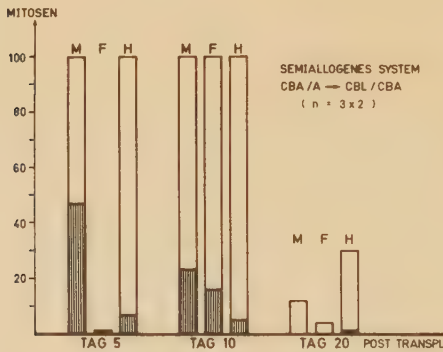
	5. Tag	10. Tag	20. Tag
Milz	50 % (14)	18 % (100)	8 % (100)
Femur	- (2)	-	- (6)
Humerus	9 % (100)	6 % (100)	- (12)



Die Abbildung verdeutlicht die Abnahme der Spenderzellen in den untersuchten Organen Milz, Femur und Humerus: im Femur waren nur sehr wenige Mitosen zu finden, in der Milz nahmen die Spenderzellen von der Hälfte auf 1/10 ab. Im Humerus waren auch am 5. Tag nur 9 % Spenderzellen.

- 2) CBA/A-F₁ und CBA/CBL-F₁ als auf einem H₂-Allel stark unverträgliche Kombination. Die entsprechende Tabelle: Bei Transplantation von CBA/A auf CBA/CBL

	5.Tag	10.Tag	20.Tag
Milz	47 % (100)	23 % (100)	- (12)
Femur	100 % (1)	16 % (100)	- (4)
Humerus	7 % (100)	5 % (100)	4 % (25)



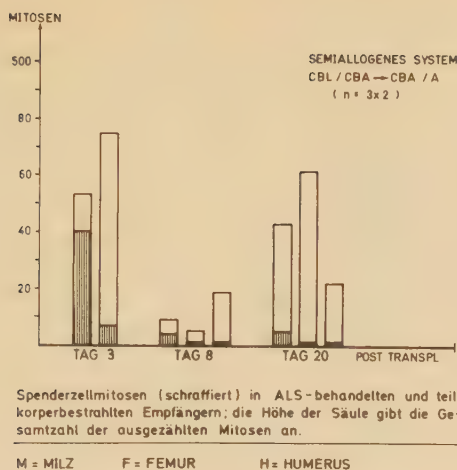
Spenderzellmitosen (schraffiert) in ALS-behandelten und teilkörperbestrahlten Empfängern; die Höhe der Säule gibt die Gesamtzahl der ausgezählten Mitosen an.

M = MILZ F = FEMUR H = HUMERUS

Aus der Abbildung lässt sich eine dem System A auf CBA ähnliche Abnahme der Spenderzellen entnehmen.

Die umgekehrte Kombination habe ich am 3., 8. und 20.Tag untersucht:

	3.Tag	8.Tag	20.Tag
Milz	75,5 % (53)	36 % (9)	11,6 % (42)
Femur	-, - (-)	20 % (5)	1,7 % (61)
Humerus	9,3 % (75)	5,3 % (19)	4,5 % (22)

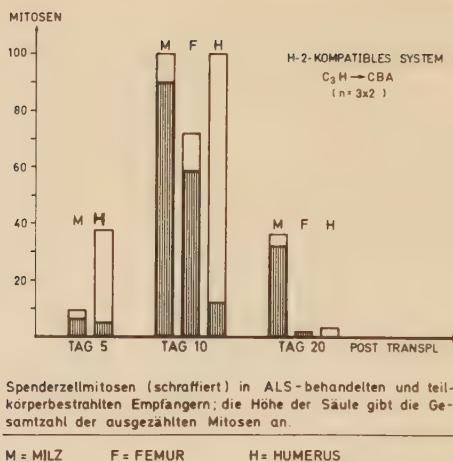


In dieser Kombination nimmt der Anteil der Spenderzellen in der Milz von 3/4 auf 1/10 ab. Die Prozentzahlen in den anderen Organen entsprechen der umgekehrten Kombination.

- 3) Die in dem für die starken Transplantationsantigene verantwortlichen H_2 -Locus identische, in den schwachen Gewebsantigenen unterschiedliche Kombination C_3H und CBA. Beide haben den H_2 -Locus k. Bei der Transplantation von C_3H auf CBA:

	5. Tag	10. Tag	20. Tag
Milz	66,6 % (9)	90 % (100)	89 % (100)
Femur	-, -	82 % (72)	100 % (1)
Humerus	17,8 % (28)	11 % (100)	- (3)

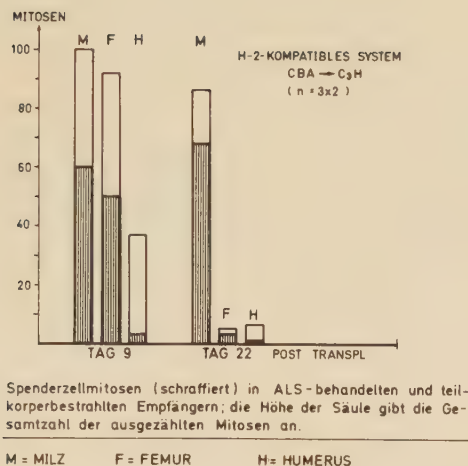
Im Gegensatz zu den stark unverträglichen Kombinationen nimmt der Anteil der Spenderzellen in den bestrahlten Knochenmarksräumen zu, im unbestrahlten Humerus hingegen ab. In den bestrahlten Räumen sind an allen Tagen mehr als die Hälfte der Mitosen vom Spenderzelltyp.



Die umgekehrte Kombination von CBA auf C₃H am 9. und 22.Tag nach der Transplantation geprüft:

	9.Tag	22.Tag
Milz	61,5 % (157)	79,5 % (86)
Femur	54,5 % (92)	60 % (5)
Humerus	8,1 % (37)	16 % (6)

Auch in dieser Kombination findet sich eine Zunahme der Spenderzellen im Verhältnis zu den Empfängerzellen, im Humerus auch, eine Zunahme im Gegensatz zu der umgekehrten Kombination.

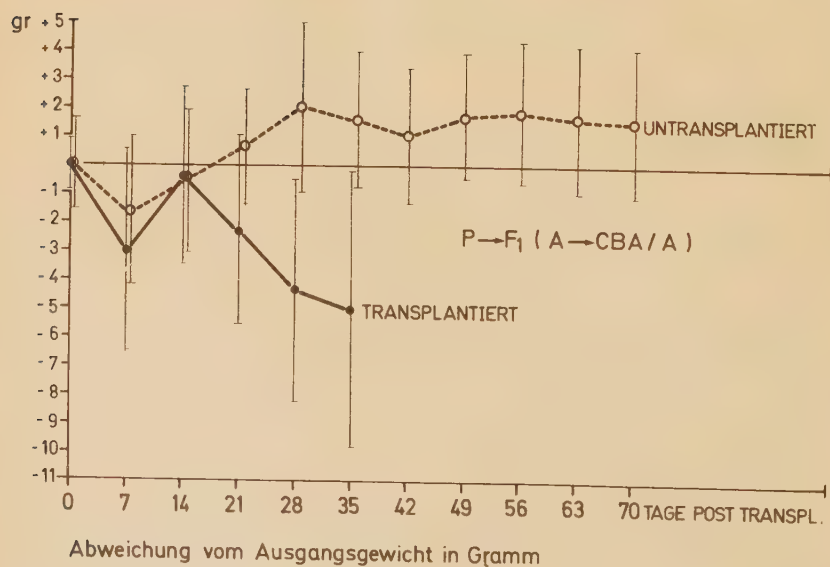


SEKUNDÄRKRANKHEIT

Die Gewichtsabnahme und die Sterblichkeit wurde bis zum 70. Tag nach der Transplantation als Ausdruck einer Sekundärkrankheit bestimmt. Die folgende Abbildung zeigt rechts eine Maus mit Sekundärkrankheit im Vergleich zu einer mit syngenen Milzzellen transplantierten Maus. Auffallend ist das kümmerliche Aussehen mit spitzem Kopf, gekrümmtem Rücken und struppigem Haar. Am Schwanz hängen Kotballen infolge des regelmässig auftretenden Durchfalls (4).

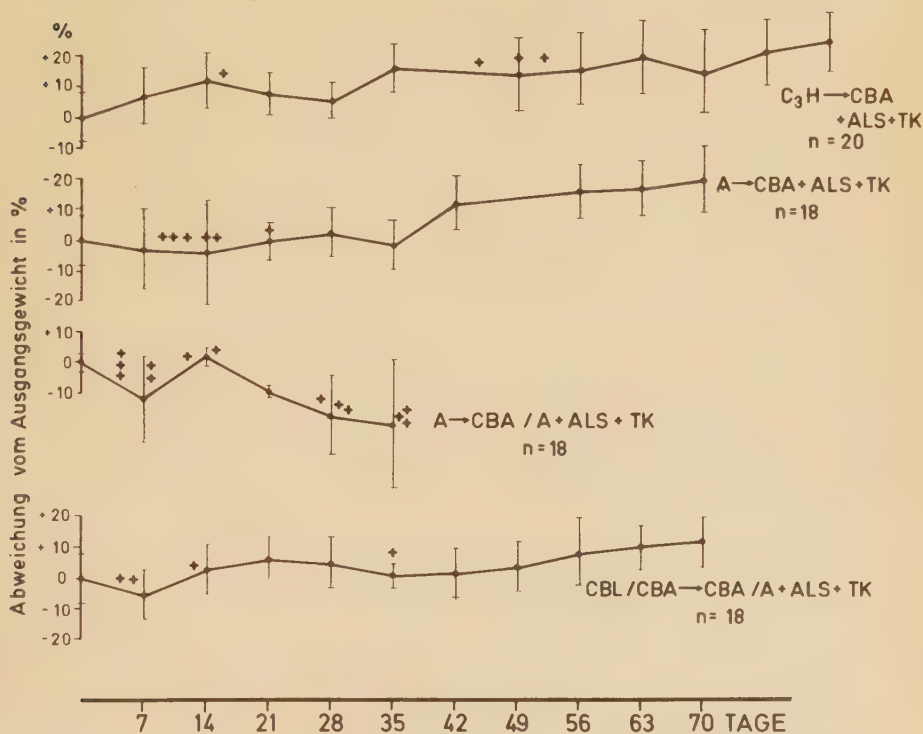
Die Gewichtsabnahme im Verlauf einer Sekundärkrankheit ist bei einer Transplantation von Parentaltieren auf die erste Filialgeneration besonders charakteristisch, da hier die elterlichen Milzzellen zwar gegen das Antigen des anderen Elternteils im Empfänger reagieren können, der Empfänger aber nicht gegen die Parentalzellen, d.h. es kommt in diesem System zu einer Graft-versus-host-Reaktion, jedoch nicht zu einer Host-versus-graft-Reaktion.

Es wurden 12 Wochen alte CBA/A-Tiere als Empfänger und 12 Wochen alte A-Tiere als Spender verwandt. Die folgende Abbildung zeigt den Verlauf



des Körpergewichts bei transplantierten, teilkörperbestrahlten und mit ALS vorbehandelten Tieren im Vergleich zu auf gleiche Weise vorbehandelten, aber untransplantierten Tieren.

Im Vergleich zu dem System Parental-auf-erste-Filialgeneration nehmen die semiallogen transplantierten und die unverwandt transplantierten Tiere weniger an Gewicht ab und weniger Tiere sterben. Im H_2 -kompatiblen System nehmen sie nach der Transplantation an Gewicht zu und 3 Tiere sterben um den 50. Tag.



Abweichung vom Ausgangsgewicht bei Transplantation in
Tagen nach Transplantation von Milzzellen.

+ = Tod eines Tieres

Alle ganzkörperbestrahlten Tiere, die unvorbehandelte, stark unverträgliche Milzzellen bekommen hatten, starben zwischen dem 6. und 20. Tag nach der Transplantation. Unter den teilkörperbestrahlten Tieren starben bis zu 15 %, die semiallogene oder unverwandte Milzzellen erhalten hatten. Die mit Parentalzellen transplantierten Empfänger starben bis zu 72 % mit einer mitt-

Todesdaten

System		Tag des Todes nach Transplantation	% der gestorbenen Tiere (Gesamtzahl)	mittlere Überlebenszeit ± Standardabweichung
<u>P - F₁</u>				
A - CBA/A	TK	5, 5, 5, 8, 8, 12, 15, 27 29, 30, 36, 37, 37	72 % (18)	19, 5 ± 13, 3
	GK	5, 5, 5, 5, 5, 5, 7, 7, 34, 39	100 % (11)	11, 2 ± 12, 5
präsens. A-Milz	TK	14, 16, 32, 42, 63, 76	100 % (6)	40, 5 ± 25, 0
<u>Semiallogen</u>				
CBA/CBL - CBA/A	TK	5, 6, 6, 13	10 % (40)	-, - ± -, -
	GK	5, 5, 5, 5, 6, 6, 7, 7, 7, 8, 8, 9, 9, 10, 10, 11, 11 12, 13, 14	100 % (20)	8, 4 ± 2, 7
Präsenz. Milz	TK	35	16, 6 % (6)	-, - ± -, -
1/2 Milz + 1/1 KM	TK	109	-, - (6)	-, - ± -, -
	GK	23, 28, 31, 49, 52, 73	100 %	42, 6 ± 18, 9
ALS-Milz	TK	-	-, - (5)	-, - ± -, -
	GK	11, 25, 41	60 % (5)	25, 6 ± 15, 0
CBA/A - CBA/CBL	TK	8, 18, 24, 25, 91	11, 4 % (35)	-, - ± -, -
	GK	6, 6, 7, 7, 8	100 % (5)	6, 8 ± 0, 8
<u>Allogen</u>				
A - CBA	TK	10, 14, 21, 15, 19, 34, 34	15, 2 % (46)	
<u>H₂-kompaubel</u>				
C ₃ H - CBA	TK	16, 46, 49, 52, 109, 126, 130, 132, 144, 151, 152, 178	15, 5 % (26)	-, - ± -, -
	GK	5, 5, 6, 6, 7, 12, 29, 29, 30	60 % (15)	14, 3 ± 11, 4
CBA - C ₃ H	TK	19, 54	22 % (9)	-, - ± -, -
AKR - CBA	TK	9, 10, 14, 14, 20	50 %	13, 4 ± 4, 3
ALS - Milz	TK	30	10 % (10)	-, - ± -, -
<u>Untransplantierte Kontrollen</u>				
nur ALS	-	-	-, - (18)	-, - ± -, -
TK + ALS		13, 34	2, 5 % (76)	-, - ± -, -
TK + ALS + syngene Milz		11	9, 1 % (11)	-, - ± -, -
GK + syngene Milz	-	-	-, - (10)	-, - ± -, -

leren Überlebenszeit von ca. 20 Tagen. Sie überlebten somit ca. 8 Tage länger als die ganzkörperbestrahlten und mit Parentalzellen transplantierten Tiere.

Eine Gruppe der CBA/A-Tiere hatte Parentalzellen erhalten, die 8 Tage zuvor mit 50 Mill. Milzzellen des anderen Elternteils sensibilisiert worden waren. Trotz vorheriger Sensibilisierung liessen diese Parentalzellen die Empfänger doppelt so lange überleben.

Im semiallogenen System liess sich mit sensibilisierten Milzzellen kein Unterschied in der Sterblichkeit bei teilkörperbestrahlten Tieren erreichen. Hingegen überlebten die ganzkörperbestrahlten Tiere, die zu den 50 Mill. Milzzellen ca. 100 Mill. Knochenmarkzellen bekommen hatten 42 Tage, während die nur mit 50 Mill. Milzzellen transplantierten nur 8,4 Tage überlebten. Die mit ALS-vorbehandelten Milzzellen transplantierte, ganzkörperbestrahlte Gruppe starb zu 60 % mit einer mittleren Überlebenszeit von 25 Tagen.

Die H_2 -kompatibel mit C_3H -Milzzellen transplantierten CBA-Tiere überlebten nach Ganzkörperbestrahlung zu 40 % den 70.Tag, nach Teilkörperbestrahlung zu 85 %. Jedoch starben nochmals 8 Tiere nach dem 100.Tag.

Die Hälfte der teilkörperbestrahlten und mit H_2 -kompatibler AKR-Milz transplantierten CBA-Tiere starb bis zum 20.Tag. War die AKR-Milz mit ALS vorbehandelt, starben 10 % der Empfänger.

Alle 18 Tiere, die nur ALS erhalten hatten und nicht transplantiert wurden, überlebten. Von 76 Tieren, die ALS bekommen hatten und teilkörperbestrahlt wurden, starben 2. Eines aus 11 syngen transplantierten Tieren mit derselben schematischen Vorbehandlung starb am 11.Tag.

IMMUNOLOGISCHE REAKTION DER SCHIMÄREN

1) zelluläre Reaktion - gegen Hauttransplantate

Die Überlebenszeit von Hauttransplantaten des Milzzellspenders und dritter Tierstämme wurde in folgenden Kombinationen verglichen (siehe tabellarische Aufstellung Seite 26): A-CBA; CBA/A - CBL/CBA; C_3H - CBA und AKR - CBA.

Stamm Milzspender	Empfänger	Hautspender	Zahl der Tiere	mittlere Überlebenszeit in Tagen	Standardabweichung
A	CBA	A	20	44,8	$\pm 11,5$
A	CBA	CBL	17	28,5	$\pm 11,6$
A-AG ₁	CBA	A	10	29,7	$\pm 9,0$
A-AG ₂	CBA	A	10	23,3	$\pm 7,2$
-	CBA	A	20	28,0	$\pm 6,8$
CBA/A	CBL/CBA	CBA/A	18	38,9	$\pm 17,5$
-	CBL/CBA	CBA/A	18	18,6	$\pm 3,5$

Bei AG₁ (12) handelt es sich um eine Antigenpräparation in Anlehnung an Monaco (12), die Milzzellen wurden durch Gefrieren und Auftauen zerstört, der erhaltene Zellbrei 20 min mit 1500 g zentrifugiert, das Zentrifugat in 0,45 %iger NaCl-Lösung 5 min inkubiert, danach 10 Min mit 1500 g zentrifugiert, von beiden Zentrifugationen die Überstände 70 min bei 40 000 U/min ultrazentrifugiert. Die bei der Ultrazentrifugation erhaltene Substanz wurde intravenös injiziert.

AG₂ bedeutet, dass der durch 3-maliges Gefrieren und Auftauen gewonnene Zellbrei intravenös gegeben wurde. Ausgangsmaterial waren 100 Mill. Milzzellen.

Gegenüber der Gruppe, die nur ALS und Teilkörperbestrahlung bekommen hatte und die A-Haut 28,0 Tage behielt, stiessen die Tiere, die A-Milzzellen 20 Tage vorher injiziert bekamen, die A-Haut erst um den 45. Tag ab. Tiere, die mit A-Milzzellen transplantiert waren, stiessen CBL-Haut um den 28. Tag ab. Die Gabe der Antigenpräparation nach Monaco führte zu keiner bedeutenden Verlängerung, während die Gabe des gesamten Zellbreis die Hauttransplantate durchschnittlich kürzer überleben liess. Waren die Empfänger nicht mit ALS vorbehandelt, aber teilkörperbestrahlt und mit A-Milzzellen transplantiert, überlebten A-Hauttransplantate $23,3 \pm 14,4$ Tage (10 Tiere). Im semiallogenen System bewirkte eine Milzzelltransplantation 20 Tage vor Hauttransplantation eine Verlängerung um ca. 19 Tage. Mit C₃H-Milzzellen transplantierte CBA-Tiere erhielten die AKR-Haut am 50. Tag nach Milzzelltransplantation, mit AKR-Milzzellen transplantierte CBA-Tiere die C₃H-Haut am 30. Tag.

Stamm Milzspender	Empfänger	Hautspender	Zahl der Tiere	mittlere Überlebenszeit in Tagen	Standardabweichung
C ₃ H	CBA	C ₃ H	20	200	-
C ₃ H	CBA	AKR	6	28,0	+ 8,8
C ₃ H-AG ₁	CBA	C ₃ H	10	51,8	+ 21,9
C ₃ H-AG ₂	CBA	C ₃ H	10	7	-
-	CBA	C ₃ H	20	39,7	+ 8,6
-	CBA	C ₃ H	10	28,7	+ 3,9
	unbehandelt				
AKR	CBA	AKR	6	150	-
AKR	CBA	AKR	10	120	-
ALS-vorbe- handelt					
AKR	CBA	C ₃ H	4	38,5	+ 4,0

Im H₂-kompatiblen System von C₃H auf CBA oder in der stärker unverträglichen Kombination von AKR auf CBA waren alle Hauttransplantate bei den mit Milzzellen vom Hautspender transplantierten Tieren voll behaart und in der ursprünglichen Grösse erhalten. Hauttransplantate von einem dritten Mausstamm wurden abgestossen. Die Gabe jeder der oben erläuterten Antigenpräparationen führte zu einer Verlängerung der Hautüberlebenszeit. Bei der mit 7 gekennzeichneten Gruppe war am 100. Tag bei einem Tier die Haut voll behaart, bei 4 Tieren die Haut unbehaart und verkleinert und bei 2 Tieren abgestossen.

In vivo mit ALS vorbehandelte Milzzellen von AKR führten auch bei CBA zu derselben anhaltenden Hauttoleranz. 10 Tiere, die ohne ALS-Vorbehandlung teilkörperbestrahlt und mit C₃H-Milzzellen transplantiert waren, behielten C₃H-Haut 29,2 ± 17,7 Tage.

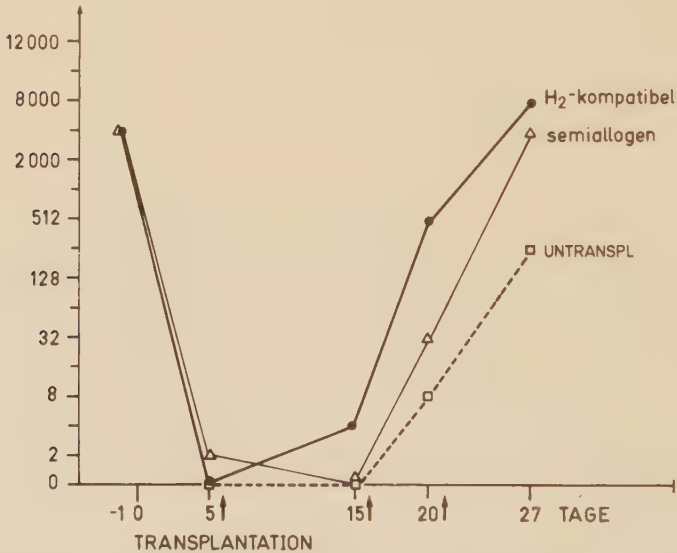
2) humorale Reaktion - gegen Hammelerythrocyten

Die Übertragungsmöglichkeit antikörperproduzierender Zellen auf teilkörperbestrahlte und mit ALS vorbehandelte Empfänger und die Fähigkeit der so entstandenen Teilschimären zur Hämagglutininbildung wurde im semiallogenen und im H₂-kompatiblen System untersucht. Dabei waren die Spender mit 200 Mill. Hammelerythrocyten an den Tagen -6, -4 und -2 sensibilisiert worden und wiesen am Tag vor der Transplantation einen Titer von 1/4000 auf. Die Schimären wurden nach jeder Blutabnah-

me am 5., 15. und 20. Tag mit derselben Menge Hammelerythrocyten geboostert, als Kontrolle dienten auf gleiche Weise vorbehandelte, aber untransplantierte Tiere.

CBA / A $\rightarrow$ CBL / CBA

HÄMAGGLUTINATION



Hammelerythrocytenagglutinine nach Transplantation hämopoetischer Zellen, die gegen Hammelerythrocyten sensibilisiert wurden.

- △ CBA / A Milzzellen auf teilkörperbestrahlte und mit ALS vorbehandelte CBL / CBA - Empfänger.
- untransplantierte teilkörperbestrahlte und mit ALS vorbehandelte CBL / CBA
- H₂ -kompatible C₃H-Milzzellen auf teilkörperbestrahlte und mit ALS vorbehandelte CBA-Empfänger
- ↑ Boosterinjektion von ca 200×10^2 Hammelerythrocyten.

Im semiallogenen System von CBA/A auf CBL/CBA war am 5. Tag ein Titer von $1/2$ nachzuweisen; am 20. Tag betrugen die Titerunterschiede 2 Stufen, am 27. Tag 5 Stufen zwischen transplantierten und untransplantierten Tieren, s. Abbildung. Im Vergleich zu H_2 -kompatibel transplantierten Empfängern sind die Titer verzögert und nicht in der gleichen Höhe nachzuweisen.

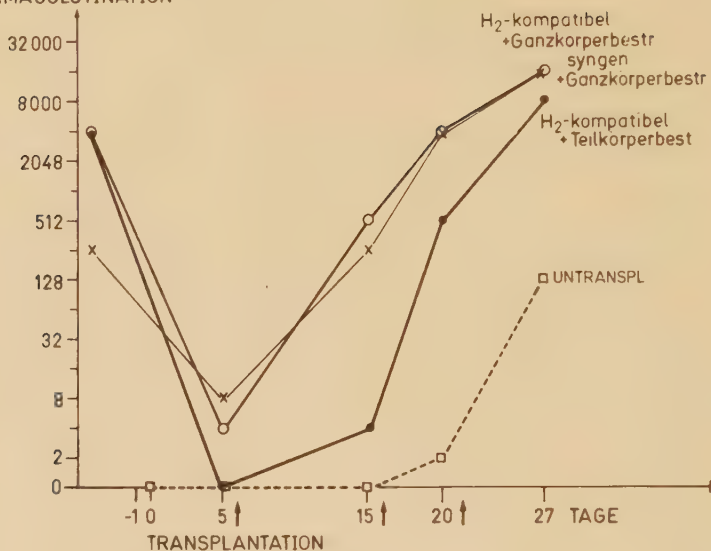
Die nächste Abbildung zeigt den Vergleich der Hämagglutinititer zwischen ganzkörperbestrahlten, syngen transplantierten und H_2 -kompatibel allogenen transplantierten Tieren einerseits und den Vergleich zwischen H_2 -kompatibel transplantierten teilkörperbestrahlten mit ganzkörperbestrahlten andererseits. Die Spender syngenetischer Milzzellen hatten am Tag vor der Transplantation einen Titer von $1/256$, der Titer war am 5. Tag nach der Transplantation im Empfänger auf $1/8$ gesunken, erreichte aber bereits nach einer Boosterinjektion den Ausgangstitel am 15. Tag. Bei den weiteren Boosterinjektionen lagen die Titer über dem Ausgangstitel von $1/256$. Ganzkörperbestrahlte und H_2 -kompatibel transplantierte Tiere hatten am 5. Tag einen um 10 Stufen niedrigeren Titer als die Spender gegenüber dem Titerabfall um 5 Stufen der syngen transplantierten Vergleichsgruppe. Sie erreichten Spendertiter erst nach zweimaliger Boosterinjektion am 20. Tag. Im Gegensatz zu den teilkörperbestrahlten und H_2 -kompatibel transplantierten Tieren hatten sie aber am 5. Tag bereits einen Titer von $1/4$. Die teilkörperbestrahlten H_2 -kompatibel transplantierten Tiere erreichten den Titer der Spender erst zwischen dem 20. und 27. Tag nach dreimaliger Boosterung. Sie hatten aber im Vergleich zu untransplantierten Tieren bereits am 15. Tag einen um 2 Stufen höheren Titer. Um festzustellen, ob die Antikörper von Spender- oder Empfängerzellen in den Teilschimären gebildet werden, wurden von diesen am 30. Tag 50 Mill. Milzzellen auf ganzkörperbestrahlte Mäuse des Spenderstammes und des Empfängerstammes rücktransplantiert. Dabei trat nach einmaliger Boosterung im Empfängerstamm ein Titer von $1/1000$ und im Spenderstamm ein Titer von $1/16$ auf.

3) Rotes und weisses Blutbild bei Teilschimären

Am 3., 10. und 20. Tag nach der Transplantation wurden bei den transplantierten Tieren Erythrocyten, Leukocyten gezählt und Differentialblutbilder hergestellt. Als Kontrolltiere galten die gleicherweise vorbehandelten, aber untransplantierten Tiere. Pro Gruppe wurden 4 Tiere unter-

C₃H → CBA

HÄMAGGLUTINATION



Hammelerythrocytenagglutinine nach Transplantation hämopoetischer Zellen, die gegen Hammelerythrocyten sensibilisiert wurden.

- H₂-kompatible C₃H-Milzzellen auf teilkörperbestrahlte und mit ALS vorbehandelte CBA-Empfänger
- H₂-kompatible C₃H-Milzzellen auf ganzkörperbestrahlte CBA-Empfänger
- × CBA-Milzzellen auf ganzkörperbestrahlte CBA-Empfänger
- untransplantierte teilkörperbestrahlte und mit ALS vorbehandelte CBA
- ↑ Boosterinjektion von ca 200x10⁶ Hammelerythrocyten

sucht. Der Normalbereich wurde aus jeweils 4 Kontrolltieren berechnet.

Die Erythrocytenzahlen wiesen nach Transplantation grosse Schwankungen auf und lagen zum Teil auch bei untransplantierten Kontrollen erheblich über dem Normalbereich, so dass von einer Auswertung abgesehen wurde.

Die Leukocytenzahlen - siehe nebenstehende Abbildung - lagen in allen drei Systemen unter dem Normbereich sowohl bei transplantierten Tieren als auch bei untransplantierten Kontrollen. Im semiallogenen System traten zwischen der transplantierten und der untransplantierten Gruppe keine Unterschiede auf. Im auf beiden H_2 -Allelen unterschiedlichen System - von A auf CBA - waren die Unterschiede besonders deutlich, indem die transplantierten Tiere am 3. Tag mehr Leukocyten, am 20. Tag weniger als die untransplantierten hatten. Am 20. Tag lag die Leukocytenzahl auch unter dem Normbereich, während die untransplantierten Kontrolltiere sich bis dahin erholt hatten.

Im H_2 -kompatiblen System von C_3H auf CBA- waren auch Unterschiede vorhanden, jedoch nicht so deutlich.

Die Untersuchung des Differentialblutbildes der oben aufgeführten Gruppen ergab: (siehe Tabelle Seite 33)

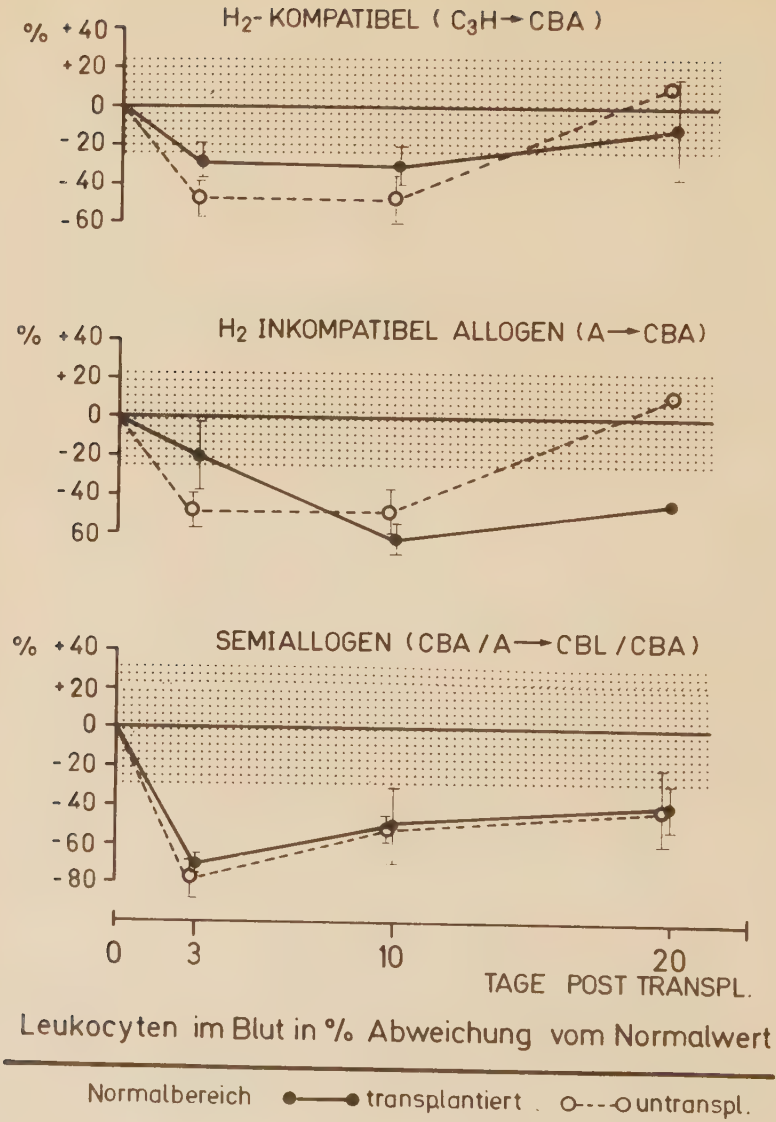
Gegenüber dem normalen Blutbild der Maus, das aus der "Unbehandelten Gruppe" zu ersehen ist, trat bei allen behandelten Tieren eine Verschiebung des weissen Blutbildes zugunsten der Granulocyten und zu ungunsten der Lymphocyten auf. Ebenso zeigen alle behandelten Tiere eine Linksverschiebung im granulocytären System. Der Anteil der Lymphocyten am weissen Blutbild nahm bei allen Gruppen zum 20. Tag hin zu, bei den transplantierten Gruppen etwas langsamer als bei den untransplantierten. Eine besonders starke Linksverschiebung trat in dem am stärksten unverträglichen System - A auf CBA - auf.

4) Histologische Untersuchung der Schimären im Vergleich zu untransplantierten Tieren am 8. und 20. Tag nach der Transplantation

Die untransplantierten CBA-Tiere zeigten am 8. Tag einen Milzindex von 0,45. Die Milzfollikel waren atrophisch, die Lymphocyten um ca. 80 % vermindert, die Erythropoese mässig gesteigert, Thrombo- und Granulopoese hochgradig vermindert.

Lymphknoten: hochgradige Atrophie.

Thymus: geringe Verminderung der Lymphocyten in der äusseren Rinde.



		Tag 3	Tag 10	Tag 20
<u>H₂-kompatibles System</u>				
C ₃ H auf CBA	Seg	78	72	48
	stb	13	11	30
	Ly	9	8	22
	Eo	0	0	0
	Mono	0	3	0
	Undiff.	0	5	0
<u>H₂-inkompatibles System</u>				
A auf CBA	Seg	67	34	28
	Stb	23	32	46
	Ly	8	14	26
	Eo	2	0	0
	Mono	0	1	0
	Undiff.	0	17	0
<u>Untransplantierte CBA</u>				
	Seg	87	69	56
	Stb	7	8	6
	Ly	6	15	38
	Eo	0	0	0
	Mono	0	1	0
	Undiff.	0	5	0
<u>Semiallogenes System</u>				
CBA/A auf CBL/CBA	Seg	71	44	43
	Stb	8	10	6
	Ly	19	26	47
	Eo	0	1	2
	Mono	2	3	2
	Undiff.	0	14	0
<u>Untransplantierte CBL/CBA-Kontrolle</u>				
	Seg	62	34	22
	Stb	8	10	4
	Ly	28	42	67
	Eo	0	3	3
	Mono	2	4	4
	Undiff.	0	7	0
<u>Unbehandelte Gruppe</u>				
	Seg	17		
	Stb	2		
	Ly	80		
	Eo	0		
	Mono	1		
	Undiff.	0		

Femur: in der Diaphyse schmale Zone mit blutbildendem Mark, in den übrigen Abschnitten Aplasie mit ausgedehnten Blutungen.

Humerus: keine pathologischen Veränderungen.

Leber, Darm, Niere und Lunge keine Veränderungen.

20. Tag Milzindex 0,73

Milz: mässige Verminderung der Follikellymphocyten, besonders periarteriolar geringe Plasmazellvermehrung, ausgeprägte Steigerung der Erythropoese. Megakaryocytenzahl: 1,1 pro Blickfeld.

Lymphknoten: ausgeprägte Atrophie

Thymus: keine pathologischen Veränderungen

Femur: im Vergleich zum Sternum geringe Vermehrung des Fettmarks.

Leber, Niere, Lunge und Darm o.B.

System A auf CBA

8. Tag Milzindex 0,46

Milz: Hochgradige Follikelatrophie, hochgradige Verminderung der extramedullären Blutbildung.

Lymphknoten: Hochgradige Atrophie mit mässiger Plasmazellvermehrung

Thymus: Makroskopisch hochgradige Atrophie, so dass er nicht einbettbar war.

Femur: völlige Markaplasie mit ausgedehnten Blutungen.

Humerus: o.B.

Leber: diskrete granulocytäre Infiltrate der Periportaltrakte und der Gallengangsepithelien.

Niere, Darm und Lunge: o.B.

20. Tag Milzindex 0,68

Milz: Ausgedehnte frische fibrinoide Follikelnekrosen mit massiv gesteigerter Granulopoese, hochgradige Verminderung der Erythropoese, annähernd normale Thrombopoese. Herdförmige Plasmazellvermehrung. Megakaryocyten/Blf. 0,8.

Lymphknoten: Hochgradige Atrophie.

Thymus: Hochgradige Atrophie.

Femur: Völliges Fehlen des Zellmarks im Femurkopf mit herdförmigen Blutungen. Hochgradig vermehrte Granulopoese. Hochgradige Verminderung der Erythropoese, massive Verminderung der Thrombopoese.

Sternum: Herdförmige Verminderung des Zellmarks, Neben Bezirken mit regelrechter Myelopoese Stellen mit hochgradig gesteigerter Granulopoese.

Leber: Ödematöse Durchtränkung der Periportaltrakte mit einzelnen Granulocyten. Lebereinzellnekrosen mit granulocytärer Reaktion.

Niere, Lunge und Darm: o.B.

System CBA /A auf CBL/CBA

8. Tag Milzindex 0,62

Milz: Hochgradige Follikelatrophie, mässige Vermehrung endothelialer Zellen mit Ausbildung von Riesenzellen, herdförmige Proliferation bei Erythroblasten, Megakaryocyten und Zellen der Granulopoese.

Lymphknoten und Thymus: hochgradig atrophisch.

Femur: vereinzelte Stellen mit erythropoetischer Blutbildung, daneben Aplasie mit ausgedehnten Blutungen.

Humerus: o.B.

Leber, Lunge, Niere und Darm: o.B.

20. Tag Milzindex 0,92

Milz: Normal- bis sehr grosse Follikel, bestehend aus Retikulumzellen; Verminderung der Lymphocyten besonders um die Zentralarterien; mässige Plasmazellvermehrung; einzelne Keimzentren; mässige Steigerung der Granulopoese und Thrombopoese, Megakaryocyten: 1,2 - 1,6/Blf. regelrechte Erythropoese.

Lymphknoten: Mässige bis hochgradige Atrophie, Verminderung der Lymphocyten, Plasmazellen und Granulocyten in den Marksträngen.

Thymus: Makroskopisch vergrössert, histologisch o.B.

Leber: vereinzelt Granulocyten in den Periportalfeldern und Gallengangsepithelien.

Femur: Mässige Vermehrung des Fettmarks, herdförmig gesteigerte, nach rechts verschobene Granulopoese.

Sternum: zellreiches Mark mit Steigerung der Granulo- und Thrombopoese.

Darm: vereinzelt plasmazelluläre Infiltrationen, sonst o.B.

Lunge, Niere o.B.

System C₃H auf CBA

8. Tag Milzindex 0,85

Milz: ausgeprägte Follikelatrophie, mässige Plasmazellvermehrung, hochgradig gesteigerte Erythropoese.

Lymphknoten: Hochgradige Atrophie.

Thymus: geringe Atrophie.

Femur: Befund fehlt.

Humerus: o.B.

Leber, Lunge, Niere, Darm: o.B.

20. Tag Milzindex 0,72

Milz: Erhaltene Milzstruktur mit grossen Follikeln. Um die Zentralarterien zahlreiche grosse mononukleäre Zellen, z.T. mit einzelnen Kerntümmern und wenig reifen Lymphocyten. Regelrechte rote Milzpulpa mit mässig gesteigerter Thrombopoese; Megakaryocyten/Blf. 2,7

Lymphknoten: Ausgeprägte Atrophie, Perilymphadenitis.

Thymus: Makroskopisch sehr klein, histologisch o.B.

Sternum: regelrechter Befund.

Femur: unauffälliges normales Knochenmarksbild.

Leber: Geringe granulocytäre Infiltration der Periportaltrakte mit einzelnen Granulocyten in der Basalmembran der Gallengänge.
In den Lebersinus einzelne Megakaryocyten.

Dickdarm: Herdförmige granulo-lymphocytäre Infiltration der tunica propria mit einer einzelnen Kryptennekrose.

Niere, Lunge, Dünndarm: o.B.

DISKUSSION

Der Ausgangspunkt der Arbeit war die Frage, ob fremdes Knochenmark ohne die Voraussetzung einer ohne folgende Transplantation tödlichen Aplasie im Empfänger anwachsen kann. Bei Transplantation syngenen Knochenmarks sind im unvorbehandelten Empfänger nur wenige Prozent Spenderzellen zu finden. Bei natürlich vorkommenden Schimären, deren Blutkreisläufe bereits vor der Geburt aneinandergespleißt sind, bleiben Spenderzellen während des ganzen Lebens in höherer Masse erhalten (Hasek + Nouza, 5). Transplantiert man syngenes Knochenmark auf teilkörperbestrahlte Empfänger, so sind in den bestrahlten Räumen ca. 2/3 der Zellen Spenderzellen, im unbestrahlten Teil ca. 1/10 (Ford et al., 6). Der Anteil der Spenderzellen blieb während 2 Jahren im bestrahlten wie im unbestrahlten Teil konstant. Ich untersuchte, inwieweit xenogene und allogene hämopoetische Zellen verschiedener Verwandtschaftsgrade in der Lage sind, die bestrahlten und die unbestrahlten Räume zu besiedeln.

Da fremde Zellen eine immunologische Abstoßung erfahren, mußten die Empfängertiere immunsupprimiert werden. Die Teilkörperbestrahlung ist nicht imstande, die immunologische Abwehr des Empfängers auszuschalten, da im unbestrahlten Teil genügend immunkompetente Zellen (bei weniger als 60 r Streustrahlung) überleben, um fremdes Gewebe abzustossen. Als immunsuppressives Agens benutzte ich Kaninchen-Anti-Maus-Lymphocyten-Serum, das auf die humorale und die zelluläre Abwehr stark hemmend wirkte. Bis zum 30. Tag nach Ende der Vorbehandlung zeigte sich weder ein Hämagglutinin-titer gegen Rattenerythrocyten, noch eine Abstoßung allogener Hauttransplantate.

Zudem teilkörperbestrahlte Tiere bildeten nach Boosterung am 30. Tag mehr Erythrocytenantikörper als nur ALS-behandelte. Die Teilkörperbestrahlung mag dabei als Proliferationsreiz auf das restliche, im unbestrahlten Teil verbliebene Knochenmark gewirkt haben und so zum schnelleren Ersatz eliminiert immunkompetenter Zellen geführt haben. Die immunsuppressive Wirkung des ALS konnte teilweise durch die Teilkörperbestrahlung aufgehoben werden. Diese Auffassung wird von Medawar (7) et al. bei Kombination von ALS und subletaler Bestrahlung vertreten.

Um Spenderzellen quantitativ in den einzelnen Knochenmarksräumen nachweisen zu können, mußte ich die cyto genetische Methode der Chromosomen-

analyse anwenden. Im xenogenen System ist es bedeutend einfacher, Spendermitosen zu erkennen, da sich Rattenmitosen durch Chromosomenzahl (42 statt 40) und die metazentrisch gelegenen Zentromere von Mitosen der Maus unterscheiden. Bei allogenen Shimären mussten die von Ford et al. 1956 (8) beschriebenen CBA-T₆-Mäuse verwandt werden. Dieser Stamm stimmt mit dem anderen CBA-Stamm in allen Transplantationsantigenen überein. Der Nachteil dieser Methode liegt in der relativ schwierigen Präparation und Auswertung, so dass nur wenige Tiere untersucht werden können.

Zudem müssen die Tiere getötet werden, weswegen man den Verlauf des Shimärismus nicht am einzelnen Tier verfolgen kann. Die Ausbeute an Mitosen schwankt trotz gleicher Methode ziemlich stark. Diese Nachteile müssen in Kauf genommen werden, wenn man einen sicheren quantitativen Nachweis der Relation von Spenderzellmitosen zu Empfängerzellmitosen erbringen will.

Die Methode, Rattengranulocyten durch Färbung infolge ihres Gehalts an alkalischer Phosphatase zu erkennen (Wachstein, 9), erlaubt eine Verlaufskontrolle bei Ratte-Maus-Schimären für die Spendermyelopoese. Sie ist quantitativ verwertbar, sagt aber nichts darüber aus, aus welcher Körperregion die Rattengranulocyten kommen. Die Färbung von Zellen im Knochenmark ist wegen der Anfärbung von Osteoblasten nicht verwertbar.

Die von Main und Prehn (10, 11) beschriebene Hauttoleranz bei Shimärismus kann als Test für das Fortbestehen eines Shimärismus gewertet werden. Als einziger Beweis des Shimärismus ist sie unsicher, da nach Antigengabe auch eine bedeutende Verlängerung der Hautüberlebenszeit auftritt (Monaco, 12). In meinen Versuchen wurde diese Methode im Anschluss an den cyto-genetischen Nachweis verwendet. Als weiteren Hinweis für eine erfolgreiche Transplantation kann mit Einschränkung die von Mitchison (13) angegebene Methode angewandt werden. Hierbei werden gegen ein Antigen sensibilisierte Milzzellen transplantiert und im Empfänger Antikörper gegen dieses Antigen nachgewiesen.

Im xenogenen System habe ich Rattenknochenmark verpflanzt, um einen ausreichenden Stammzellgehalt auch im ganzkörperbestrahlten Empfänger zu garantieren (14). Abgesehen vom xenogenen System waren die Kombinationen so ausgesucht, dass sie Analogieschlüsse auf den Menschen zuließen. Eine Transplantation von A auf CBA würde beim Menschen einer Transplantation zwischen zwei unverwandten Menschen entsprechen. Die Kombination

CBA/A-F₁ und CBA/CBL-F₁ ist ein Modell für die Transplantation zwischen Eltern und Kindern oder 3/4 der Geschwister. Die Kombination C₃H auf CBA sowie AKR auf CBA wäre der HLA-identischen Kombination beim Menschen analog. CBA, C₃H und AKR haben den gleichen für die starken Gewebsantigene verantwortlichen H₂-Locus, nämlich H₂k. AKR unterscheidet sich von CBA in zwei geringer ausgeprägten Antigenen, C₃H von CBA nur in einem. A besitzt den H₂-Locus a und CBL den H₂-Locus b.

I. FAKTOREN BEIM EINWACHSEN DES TRANSPLANTATES

Im xenogenen System waren in keinem teilkörperbestrahlten Tier Rattenleukocyten nachweisbar, während ganzkörperbestrahlte Tiere am 6. Tag bereits 50 - 80 % Rattenleukocyten im peripheren Blut zeigten. Rattenleukocyten in teilkörperbestrahlten Tieren traten auch nicht auf, wenn die Strahlendosis aus 1500 r erhöht oder das Intervall zwischen Ende der ALS-Behandlung und Transplantation auf 5 Tage verlängert wurde. Erst wenn ein so grosser Teil des Körpers bestrahlt wurde, dass die untransplantierten Kontrolltiere starben, waren Rattenleukocyten festzustellen. Die Rattenzellen waren am 3. Tag in den bestrahlten Knochenmarksräumen zu finden, am 8. Tag allerdings verschwunden. Das Rattenknochenmark war zwischen beiden Tagen eliminiert worden und hatte wahrscheinlich keine Granulocyten produziert. Ein Auftreten von Rattengranulocyten vor dem 6. Tag ist nicht auszuschliessen, jedoch war der Prozentsatz der Rattengranulocyten am 6. Tag auch bei ganzkörperbestrahlten Tieren im Vergleich zu später recht unterschiedlich.

Es kam in den bestrahlten Partien also zu einer Umkehr von über 3/4 Spenderzellen zu fast nur Empfängerzellen. Diese Umkehr kann immunologisch bedingt sein durch die Abwehr des Empfängers, wobei zu überlegen wäre, wieso die gleichen, jedoch untransplantierten Tiere weit über diese Zeitspanne hinaus immunsupprimiert sind. Eine zweite Erklärungsmöglichkeit ist eine Verdrängung der Spenderzellen durch empfängereigene, die in ihrem Milieu einen Proliferationsvorteil besitzen könnten.

Im allogenen stark unverträglichen System (A auf CBA) nahmen die Spenderzellen auch ab, aber wesentlich langsamer; es waren am 20. Tag noch 10 % Spenderzellen in der Milz nachweisbar. Im semiallogenen System (CBA/A auf CBA/CBL) und umgekehrt (CBA/CBL auf CBA/A) war eine ähnliche Ab-

nahme festzustellen. Anders im H_2 -kompatiblen System (C_3H auf CBA und umgekehrt), wo eine Zunahme des Anteils der Spenderzellen zu sehen war. Daraus muss man schliessen, dass bei der Transplantation von hämopoetischen Zellen, hier Milzzellen, die starken Gewebsantigene, bei der Maus durch den H_2 -Locus kontrolliert, eine wesentliche Rolle spielen. Der Mechanismus des Verdrängens der Spenderzellen kann verschiedene Ursachen haben:

1) immunologische Abstossung durch ungenügende Immunsuppression des Empfängers; diese lässt sich mit der starken Immunsuppression, wie sie im Vorversuch gezeigt wurde, nicht vereinbaren. Eine durch das Transplantat bedingte schnellere Restitution der Immunabwehr des Empfängers ist unwahrscheinlich.

2) nicht-immunologische Abstossung

Der Proliferationsvorteil der empfängereigenen Zellen ist so gross, dass die fremden Zellen überwuchert und verdrängt werden; vorstellbar wäre der Proliferationsvorteil durch das bessere Ansprechen auf humorale stimulierende Faktoren oder durch das bessere Einpassen der empfängereigenen Zellen durch die mit der Umgebung gleichen Strukturen der Zelloberflächen.

Die Tatsache, dass nach dem Verschwinden der Spenderzellen trotzdem eine verlängerte Überlebenszeit der Spenderhaut die Regel ist, spricht ganz gegen eine immunologische Abstossung der fremden Zellen. Warum sollte die Abwehr des Empfängers das Knochenmark abstossen und die Haut desselben Spenders länger schonen als es untransplantierte Kontrolltiere tun? Empfänger hätten zudem die Möglichkeit, gegen Spenderantigene sensibilisiert zu werden. Das Überleben der fremden Zellen kann folglich nicht von der Immunabwehr des Empfängers beeinträchtigt werden. Da humorale Faktoren meist nicht besonders spezifisch auf ihre Zielzelle sind - wie bei den Hormonen - neige ich zu der Auffassung, dass das Überleben von Fremden Zellen in stark immunsupprimierten Tieren von der Histokompatibilität auf lokaler Ebene, also von der Identität ihrer Oberflächenantigene abhängt.

Das Nichtangehen von Rattenhauttransplantaten auf den kurzzeitigen Teilschimären, stimmt mit den Ergebnissen von Zaalberg (27) et al. überein, der zeigen konnte, dass Ratte-Maus-Schimären, die teilweise zum Mauszelltyp zurückgekehrt waren, die Rattenhauttransplantate abstiessen.

II. IMMUNOLOGISCHE REAKTIONEN BEI SCHIMÄRISMUS

1) Sekundärkrankheit

Die Sekundärkrankheit tritt nach Transplantation von Knochenmark oder Milz auf und beruht auf der immunologischen Schädigung des Wirtes durch die immunkompetenten Zellen des Transplantates, der Graft-versus-Host-Reaktion. Die Stärke und der Zeitpunkt der Manifestation nach der Transplantation hängen wesentlich von dem Gehalt an immunkompetenten Zellen im Transplantat ab. Milzzellen führen zu einer akuten Sekundärkrankheit bei ganzkörperbestrahlten Empfängern, d.h. die Empfänger sterben innerhalb von 20 Tagen, Knochenmark führt zur chronischen Sekundärkrankheit - durch Fehlen bestimmter immunkompetenter Zellen - zum Tod nach 30 - 60 Tagen bei Vorbehandlung mit Ganzkörperbestrahlung (2).

Die pathologisch-anatomischen Zeichen einer Sekundärkrankheit sind lymphocytaire Infiltrate in Haut und Schleimhäuten, Einzelzellnekrosen in der Leber, Erhöhung des Milzindex, d.i. Milzgewicht im Verhältnis zum Gewicht der linken Niere, und Aplasie des lymphatischen Gewebes (15). Das klinische Bild ist geprägt von Dermatitis, Diarrhoe und Gewichtsverlust, dabei ist die Dermatitis bei der Maus schwach ausgebildet (4).

Abzugrenzen ist die Sekundärkrankheit gegenüber Schäden durch die Bestrahlung, oder/und Infektionen (16). Bestrahlungsschäden müssten auch bei den untransplantierten Kontrolltieren oder in syngen transplantierten Kontrollen eine Sterblichkeit bedingen. Die supraletal ganzkörperbestrahlten und syngen transplantierten Tiere starben nicht. Von 76 teilkörperbestrahlten und untransplantierten Tieren starben 2. Infektionen als Todesursachen sind nicht immer auszuschliessen, jedoch bildeten transplantierte Tiere im Vergleich zu untransplantierten Tieren mit derselben immunsuppressiven Vorbehandlung mehr humorale Antikörper, wenn die Spender vorher sensibilisiert waren. Andererseits nahm die Zahl peripherer Lymphocyten bei transplantierten Tieren langsamer zu als bei untransplantierten Kontrolltieren. Auffällig war bei transplantierten Tieren die am 8. Tag in allen Systemen auftretende Thymusatrophie. Diese beiden Befunde stellen die Frage, ob es sich nicht hauptsächlich um eine Inkompetenz des zellulären Systems handelt. Die Bildung humoraler Antikörper könnte in Schimären besser funktionieren und die Resistenz gegen Infektionen trotzdem geringer sein.

Nach der Transplantation von parentalen Milzzellen auf ganzkörperbestrahl-

te F_1 -Empfänger starben alle Tiere mit einer mittleren Überlebenszeit von ca. 11 Tagen. In derselben Kombination starben nur $3/4$ der teilkörperbestrahlten Empfänger mit einer mittleren Überlebenszeit von 19 Tagen. Der Empfänger spielt also bei der Graft-versus-Host-Reaktion auch eine Rolle, insofern also bei teilkörperbestrahlten Empfängern weniger Tiere sterben und die Tiere im Durchschnitt länger überleben. Um die Sterblichkeit bei diesen Empfängern zu steigern, gab ich einer Gruppe gegen die Empfänger sensibilisierte Milzzellen. Es starben zwar alle Tiere, aber sie überlebten im Durchschnitt 40 Tage. Dieses überraschende Ergebnis ist schwer zu erklären. Kam es in der Milz zur Bildung humoraler Antikörper, die nach Transplantation einen Enhance-Effekt zeigten? Der Enhance-Effekt beruht auf einer antagonistischen Wirkung humoraler und zellulärer Antikörper.

Im semiallogenen System kam es zum Tode von nur 10 % der Empfänger-tiere, was sich durch das Verschwinden der aggressiven Spenderzellen erklären lässt. Hier versuchte ich die Mortalität zu steigern, indem ich zu den 50 Mill. Milzzellen 100 Mill. Knochenmarkzellen hinzugab. Es starben nicht mehr teilkörperbestrahlte Tiere, aber bei ganzkörperbestrahlten war eine Verlängerung der Überlebenszeit von 8 auf 42 Tage zu erreichen. Dieser Versuch ist mit der Situation in teilkörperbestrahlten Tieren vergleichbar insofern, als statt der Belassung von funktionsfähigem Knochenmark im unbestrahlten Teil des Empfängers hier Knochenmark des Spenders zugegeben wird. In diesem Versuch sterben zwar alle Tiere, jedoch wesentlich später als die nur mit Milzzellen transplantierten, ganzkörperbestrahlten Tiere. Die hinzugegebenen Knochenmarkzellen haben die Milzzellen in ihrer Graft-versus-Host-Aktivität gehemmt. Eine Erklärung dieses Befundes ist die Beschränkung des Raumes, in dem die Milzzellen proliferieren können. Bevor es zu einer Sekundärkrankheit kommt, müssen die transplantierten Milzzellen also die räumlichen Möglichkeiten zur Proliferation haben. Knochenmark führt bei Nagern zu einer chronischen Sekundärkrankheit und ist nicht innerhalb der ersten 20 Tage zu einer tödlichen Graft-versus-Host-Reaktion fähig.

Bei dem Versuch die Sekundärkrankheit zu vermindern, indem ich die Spender mit ALS vorbehandelte, starben keine der teilkörperbestrahlten Tiere, von den ganzkörperbestrahlten statt 100 % nur 60 %.

Im stark unverträglichen allogenen System, A auf CBA, trat eine tödliche Sekundärkrankheit in 15 % der teilkörperbestrahlten Tiere auf. Die etwas höhere Sterblichkeit stimmt mit den ausgeprägteren histologischen Befunden

einer Sekundärkrankheit überein. Thymus und Lymphknoten waren hochgradig atrophisch, es kam zu Nekrosen einzelner Leberzellen und Infiltraten in den Periportaltrakten. Da in diesem System die Spenderzellen ebenso schnell verschwinden wie in dem semiallogenen System, muss die stärkere Graft-versus-Host-Reaktion auf einer stärkeren immunologischen Aktivität beruhen.

Im H_2 -kompatiblen System starben zwar nur 60 % der ganzkörperbestrahlten Empfänger, aber ebenfalls 15 % der teilkörperbestrahlten Empfänger. Das besagt, dass die immunologische Reaktion in diesem System schwächer ist, wie es sich aus dem Vergleich ganzkörperbestrahlter H_2 -inkompatibel und H_2 -kompatibel transplantierte Empfänger ergibt. Jedoch führen H_2 -kompatible Milzzellen wegen ihrer besseren Überlebenschance in nicht-aplastischen Empfängern verhältnismässig häufiger zu einer Sekundärkrankheit. Im ebenfalls H_2 -kompatiblen, aber in den schwachen Gewebsantigenen stärker unverträglichen System AKR auf CBA kommt es bei teilkörperbestrahlten Empfängern sogar in 50 % zu einer Sekundärkrankheit. Bei der Beurteilung der Sekundärkrankheit spielt neben der unterschiedlichen immunologischen Reaktion auch die Überlebenschance der Spenderzellen eine wichtige Rolle und diese ist mit der Identität des H_2 -Locus eng gekoppelt. Die Überlebenschance H_2 -inkompatibler Zellen ist nur in aplastischen Tieren gross genug, um in der Mehrzahl der Empfänger zu einer Sekundärkrankheit zu führen. Spenderknochenmarkzellen können durch Einschränkung des Proliferationsraumes Milzzellen vom gleichen Spender an der Auslösung einer akuten Sekundärkrankheit behindern.

Eine ALS-Vorbehandlung des Spenders senkt die Häufigkeit einer Sekundärkrankheit in teilkörperbestrahlten wie in ganzkörperbestrahlten Empfängern. Die ALS-Wirkung auf die Milz besteht in einer Entleerung der periarteriolären Zonen von Lymphocyten, daneben treten vermehrt Plasmazellen auf. Dadurch wird eine zelluläre Reaktion des Spenders gegen den Empfänger vermindert. Neben der absoluten Verminderung der Lymphocyten in der Milz mag eine Hemmung durch "sterile Aktivierung" (Medawar, 7), also nicht durch Verminderung der Zahl, eine Herabsetzung der Graft-versus-Host-Aktivität bewirken. Die Auffassung der Kombination beider Wirkungen des ALS vertritt Thierfelder (17) et al. Er konnte durch Toleranzinduktion gegenüber dem ALS die immunogene Komponente ausschalten und zeigen, dass die cytotoxische Komponente alleine nicht zu einer so starken Unterdrückung der Graft-versus-Host-Reaktion führt.

2) Hauttoleranz

Nach xenogener Knochenmarktransplantation wuchsen die Hauttransplantate des Spenders nicht an. Dasselbe konnten Zaalberg (27) et al. bereits 1957 zeigen, er sah bei partiellen Reversals im Ratte-Maus-System eine Abstossung der Rattenhauttransplantate.

In allen allogenen H_2 -inkompatiblen Systemen war eine Verlängerung der Hautüberlebenszeit zu sehen, obwohl die Milzzellen zu diesem Zeitpunkt bereits abgestossen waren. Diese Verlängerung war spezifisch für die Hauttransplantate anderer Stämme. Man kann also von einer Toleranz reden, wenn man darunter eine antigenspezifische verminderte Reaktion versteht. Ich versuchte dieselbe Verlängerung durch Gabe zellfreien Antigens zu erreichen. Dabei überlebten die Hauttransplantate bei teilkörperbestrahlten und ALS-behandelten Tieren, die eine Antigenpräparation nach Monaco (12) statt lebender Zellen erhalten hatten, nicht länger als die Hauttransplantate bei sonst gleich vorbehandelten Tieren, die kein Antigen bekommen hatten.

Gab ich den ungereinigten Brei der durch Gefrieren und Auftauen zerstörten Zellen, wurden die Hauttransplantate sogar früher abgestossen. Die Menge des Antigens entsprach der Antigenmenge von 100 Mill. Milzzellen, also der doppelten Menge der transplantierten Milzzellen. Mit dieser Kontrolle versuchte ich zu zeigen, dass man mit Antigengabe nicht dieselbe Toleranz herbeiführen kann. Jedoch ist es unmöglich die bei der Transplantation lebender Zellen wirksam werdende Menge an Antigen herauszufinden, da es sich dabei um bei Proliferation sich selbst reproduzierender Antigenmengen handelt. Die Toleranz war zudem unvollständig, da die Hauttransplantate nur geringes oder gar kein Haarwachstum zeigten. Trotzdem besteht kein Zweifel an dem Überleben der Hauttransplantate, die langsam an Grösse abnahmen und als abgestossen galten, wenn nur nur 10 % der ursprünglichen Grösse vorhanden war oder die Haut blutunterlaufen war.

Im allogenen H_2 -kompatiblen System wurde durch Transplantation von Milzzellen bei allen Tieren eine anhaltende Hauttoleranz erzeugt. Hier waren zum Zeitpunkt der Hauttransplantation Spenderzellen in hohem Masse zu finden. Eine immunologische Abstossung der Milzzellen nach dem 20. Tag wäre mit der persistierenden Hauttoleranz nicht vereinbar. Diese Hauttoleranz war sehr spezifisch, da nach Transplantation von AKR-Milzzellen, die sich von C_3H und CBA in mehr Antigenen unterscheiden als die beiden letztgenannten voneinander, C_3H -Hauttransplantate abgestossen und AKR-Haut-

transplantate erhalten wurden.

Auf welchem Mechanismus die erzielte Toleranz beruht, ist aus den Ergebnissen nicht zu ersehen. Das naheliegendste ist eine Toleranzinduktion durch Schimärismus, wie sie von Main und Prehn 1955 (10, 11) beschrieben wurde. Dabei wird das Immunsystem des Empfängers durch das des Spenders ersetzt. Das stimmt sicherlich für vollständige Schimären wie sie mit Hilfe der Ganzkörperbestrahlung erzeugt werden. Bei Teilschimären sind hingegen noch potentiell immunkompetente Empfängerzellen da. Das Knochenmark im unbestrahlten Teil kann Vorläufer von immunkompetenten Zellen produzieren und so kann sich der Empfänger wieder ein funktionierendes Immunsystem aufbauen, wenn er nicht von den Spenderzellen daran gehindert wird. In Lymphknoten von C_3H -Empfängern konnte ich vereinzelt Spenderzellen nachweisen, doch bereitete die Mitosenpräparation aus Lymphknoten so grosse Schwierigkeiten, dass sie nicht auszuwerten war.

Gegen diese Theorie der Übernahme des Immunsystems durch den Spender spricht folgender Versuch: gegen Hammelerythrocyten sensibilisierte Milzzellen von C_3H wurden auf CBA transplantiert; nachdem in den Teilschimären Anti-Hammel-Hämagglutinine nachweisbar waren, transplantierte ich die Milz dieser Teilschimären zurück auf ganzkörperbestrahlte CBA- und C_3H -Tiere; der Hämagglutinititer war nach einer Boosterinjektion in CBA höher als in C_3H . Daraus muss man folgern, dass die antikörperproduzierenden Zellen in der Milz der Teilschimären zu diesem Zeitpunkt, am 30. Tag, empfängereigene Zellen waren.

Im humoralen System kann man durch Antigengabe in besonders kleinen oder besonders grossen Mengen Toleranz erzeugen (Dresser, 18, 28). Bei der Knochenmarkstransplantation kann es sich nicht um besonders kleine Mengen handeln. Die besonders grosse Menge an Antigen könnte zu einer Vernichtung durch Überforderung der ansprechenden Lymphocyten führen - "allergic death of Lymphocyte" (19).

Hinzu kommt, dass es sich bei der Transplantation von Knochenmark nicht um lösliche und reine Antigene wie bei Dresser handelt. Sie wäre eher der Toleranzinduktion gegenüber Hammelerythrocyten vergleichbar, da diese auch Antigene auf lebenden Zellen darstellen. Bei dieser Toleranzinduktion ist jedoch eine Behandlung mit Cyclophosphamid notwendig (20). Die Rolle des Cyclophosphamid könnte bei der Knochenmarkstransplantation die cytotoxische Wirkung des Transplantates übernehmen, das auch durch cytotoxische Wirkung auf die Lymphocyten des Empfängers immunsuppressiv wirkt.

Einen widersprechenden Befund stellt die Toleranzinduktion durch ALS-vorbehandelte Milz dar. Jedoch wäre auch hier eine allerdings später auftretende cytotoxische Wirkung nicht auszuschliessen. Diese Theorie stimmt nicht mit den Befunden von Thomas und Storb (21) überein, die fanden, dass bei totalen Schimären - bei Hunden - periphere Lymphocyten cytotoxisch auf Empfängerfibroblasten in der Kultur wirkten. Der cytotoxische Effekt war aufgehoben, wenn Empfängerserum zu der Kultur zugegeben wurde. Das würde eher für eine Toleranz durch hemmende humorale Faktoren, d.h. enhancing antibodies, sprechen. Mit Hilfe des Enhance-Effekt liesse sich die über die Anwesenheit von Spenderzellen hinaus wirksame Hauttoleranz bei stark unverträglichen Kombinationen erklären.

3) Hämagglutininproduktion

Die Möglichkeit Antikörper produzierende Zellen zu transplantieren wurde anhand der Hämagglutininbildung gegen Hammelerythrocyten geprüft. Die Spender waren sensibilisiert worden und die Empfänger wurden nach jeder Blutabnahme geboostert. Bei der Transplantation sensibilisierter syngener Zellen auf ganzkörperbestrahlte Empfänger kommt es zu einem Abfall des Titors, der sich dadurch erklären lässt, dass nicht alle antikörperproduzierenden Zellen transplantiert wurden, darüber hinaus können antikörperproduzierende Zellen bei der Transplantation untergehen. Nach einer Boosterinjektion ist der Ausgangstiter des Spenders erreicht.

Bei der Transplantation H_2 -kompatibler allogener Zellen wurde der Ausgangstiter erst nach 2 Boosterinjektionen am 20. Tag wieder erreicht; der Titerabfall bei der Transplantation ist stärker als nach syngener Transplantation. Der stärkere Titerabfall muss durch die Unterschiedlichkeit der Gewebsantigene zu erklären sein, wobei entweder durch das Übermass an Antigenen des Empfängers die Antikörperproduktion gegen Hammelerythrocyten benachteiligt wird oder die fremde Umgebung ohne immunologischen Reiz eine für die Antikörperproduktion ungünstigere Voraussetzung darstellt. Beide Erklärungen können auch für die unterschiedlich starke Reaktion im H_2 -kompatiblen System und im semiallogenen System bei teilkörperbestrahlten Empfängern zutreffen. Die niedrigeren Titer bei teilkörperbestrahlten Empfängern als bei ganzkörperbestrahlten werden durch die Einschränkung des zur Proliferation angebotenen Raumes erklärt.

Wie aus dem Versuch der Rücktransplantation von Milzmark aus 30-tägigen

Teilschimären hervorgeht, sind zu diesem Zeitpunkt die Antikörper bildenden Zellen vorwiegend vom Empfängertyp. Es war jedoch im Vergleich zur syngen Transplantation auf ganzkörperbestrahlte Empfänger ein stärkerer Titerabfall zu verzeichnen. Der Titer am 27.Tag in den Teilschimären betrug 1/1000 und nach Transplantation war am 3.Tag weder in der dem Spender noch der dem Empfänger syngen Gruppe ein Titer nachweisbar. Nach einmaliger Boosterinjektion bildete die dem Empfänger syngene Gruppe einen Titer von 1/1000, während die dem Spender syngene Gruppe nur einen Titer von 1/16 erreichte (am 13.Tag nach Rücktransplantation).

Das spricht einerseits dafür, dass der in Teilschimären zu verzeichnende Titer von empfängereigenen Zellen gebildet wird, andererseits jedoch auch dafür, dass diese empfängereigenen Zellen durch die anwesenden Spenderzellen in ihrer Antikörperbildung gehemmt werden. Nach Wegnahme der räumlichen Beschränkung, wie sie im teilkörperbestrahlten Tier vorhanden ist, ist also eine gegenseitige Behinderung zu sehen, wie sie auch aus dem Vergleich syngen und allogenen auf ganzkörperbestrahlte Empfänger hervorgeht. Man kann wiederum nicht ersehen, ob diese gegenseitige Behinderung durch eine immunologische Reaktion gegeneinander oder durch die in einer Mischpopulation ungünstigere Umgebung bedingt ist.

Da der Titer am 30.Tag vorwiegend von Empfängerzellen gebildet wird, kann der in transplantierten Tieren im Vergleich zu untransplantierten höhere Titer nur auf einer Anregung der Empfängerzellen durch die Spenderzellen beruhen. Am einfachsten wäre sich diese Anregung als eine Informationsübermittlung von den Spenderzellen gemäss den Experimenten von Miller (22) vorzustellen.

III. WEISSES BLUTBILD UND HISTOLOGIE

Unbehandelte Mäuse hatten im peripheren Blut ca. 3000 Leukocyten/mm³, darunter 80 % Lymphocyten. Nach meinem Vorbehandlungsschema behandelte Mäuse haben 60 - 90 % Granulocyten und nur 10 - 30 % Lymphocyten, was vorwiegend auf der ALS-Wirkung beruht. Dabei zeigten sich CBL/CBA-Mäuse mit ca. 30 % Lymphocyten auf die ALS-Wirkung weniger empfindlich als CBA-Mäuse.

Die Leukocytenzahlen nach Transplantation waren bei CBA-Empfängern am

3.Tag höher und am 20.Tag niedriger als bei untransplantierten Kontrolltieren. Im semiallogenen System differierten die Leukocytenzahlen nicht. Eine deutliche Linksverschiebung in der granulocytären Reihe trat bei transplantierten CBA-Tieren auf, besonders stark im unverträglicheren System A auf CBA. Die Erholung von der peripheren Lymphopenie ging in den untransplantierten Tieren schneller vonstatten. Ein Hinweis auf die Ursache mag die bei transplantierten Tieren auftretende Thymusatrophie bedeuten.

Beides kann jedoch auch durch die gleiche cytotoxische Wirkung des Transplantates bedingt sein. Der Thymus der semiallogen transplantierten Tiere ist am 20.Tag nach der Transplantation makroskopisch vergrößert und histologisch unauffällig. Entsprechend sind in diesem System die Lymphocytenzahlen auf 2/3 der Leukocyten an diesem Tag angestiegen.

Der Milzindex - Verhältnis des Milzgewichtes zum Gewicht der linken Niere - differiert im starken allogenen System nicht von der untransplantierten Kontrolle, im H_2 -kompatiblen System ist er sowohl am 8. wie am 20.Tag erhöht und im semiallogenen System nimmt er vom 8. zum 20.Tag um 50 % zu und beträgt ungefähr das doppelte des normalen. Im Simmons-Assay (23) wird die Zunahme des Milzgewichtes neugeborener Mäuse zum Nachweis fremder Zellen verwandt, jedoch Fox (24) et al. konnte bei erwachsenen Tieren zeigen, dass die Zunahme nach Transplantation fremder Zellen durch eine Proliferation empfängereigener Zellen bedingt ist, als überschüssige Reaktion auf die cytotoxische Wirkung der Fremdzellen zu verstehen.

Diese Reaktion ist stärker im semiallogenen System und entspricht der besseren Erholung der peripheren Leukopenie. Im stark unverträglichen System kommt es zu keiner Überschussreaktion, was zu der peripheren Leukopenie und zu den histologischen Befunden einer stärkeren Graft-versus-Host-Reaktion passt. Im H_2 -kompatiblen System ist der Milzindex an beiden Tagen erhöht, es kann sich aber nicht um eine Überschussreaktion des Empfängers handeln da an beiden Tagen vorwiegend Spenderzellen nachgewiesen wurden. Die Zunahme des Milzgewichtes beruht nicht auf einer Zunahme der Lymphocyten, sondern einer gesteigerten Granulo-, Erythro- und Thrombopoese. Sie ist also nicht als Überschussreaktion der lymphatischen Reihe zu verstehen und bedeutet nicht die Inangasetzung einer immunologischen Reaktion.

ZUSAMMENFASSUNG

Es wurden die Möglichkeiten, Knochenmark auf nicht-aplastisch gemachte Tiere zu verpflanzen, in verschiedenen genetischen Systemen untersucht. Die Tiere waren mit Teilkörperbestrahlung und ALS vorbehandelt, einer Behandlung, an der ohne darauffolgende Transplantation nur 2 von 76 Tieren starben. Die Spenderzellen wurden mit cytogenetischen Methoden nachgewiesen. Die resultierende Sekundärkrankheit wurde als Indiz angewachsener immunkompetenter Zellen mit der homologen Krankheit verglichen. Die immunologischen und hämopoetischen Funktionen der Schimären wurden anhand der Hautüberlebenszeit, Hämagglutininbildung und Veränderungen im weissen Blutbild und histologischen Bild geprüft.

- 1) im xenogenen System - von Ratte auf Maus - wurden Spenderzellen zwischen dem 3. und 8. Tag abgestossen; es kam daher zu keiner Sekundärkrankheit; Hauttransplantate wuchsen nicht an.
- 2) Im stark unverträglichen allogenen System wurden Spenderzellen langsam bis zum 20. Tag eliminiert; 15 % der Tiere starben im Verlaufe einer Sekundärkrankheit; Hauttransplantate vom Spender wurden verzögert abgestossen; die Veränderungen im weissen Blutbild sowie im histologischen Bild zeigten eine Schädigung der Hämpoese und Anzeichen einer Sekundärkrankheit.
- 3) im semiallogenen System nahm der Anteil der Spenderzellen ebenfalls langsam bis zum 20. Tag ab; nur 10 % der Tiere starben an einer Sekundärkrankheit; es kam zu einer längeren Überlebenszeit von Spenderhauttransplantaten; Hämagglutinine wurden verzögert, jedoch mehr als in untransplantierten Tieren gebildet; Blutbild und Histologie zeigten eine schnelle Erholung.
- 4) im H_2 -kompatiblen System war der Anteil der Spenderzellen am 20. Tag genauso hoch wie am 5. Tag; bei 15 - 50 % kam es zu einer tödlich verlaufenden Sekundärkrankheit; bei allen Tieren entstand eine anhaltende und vollständige Toleranz gegen Spenderhauttransplantate, wenn die Sekundärkrankheit durch eine vorausgegangene ALS-Behandlung der Milzzellspendertiere ausgeschaltet worden war; Hämagglutinine

wurden innerhalb von drei Wochen in höherem Masse gebildet, jedoch nicht so schnell wie in ganzkörperbestrahlten Empfängern; die Veränderungen des Blutbildes und des histologischen Bildes sprachen für eine geringe Schädigung der Hämpoese bei deutlichen Zeichen einer Graft-versus-Host-Reaktion dort, wo die Sekundärkrankheit nicht mit ALS ausgeschaltet worden war.

Als Mechanismus der Abstossung transplanterter Zellen wurde ein immunologischer und ein nicht-immunologischer im Zusammenhang mit dem H_2 -Locus der Maus diskutiert. Als Argument für die nicht-immunologische Abstossung wurde die nach Verdrängung der Milzzellen noch anhaltende Immuntoleranz gegenüber Hauttransplantaten des Milzzellspenders gewertet.

LITERATURVERZEICHNIS

- 1 Van Bekkum D.W. and De Vries M.J.
In "Radiation chimera"
Logos Press limited 1967, S.20-22
Academic Press Inc., London limited Berkley Square House
Berkley Square London W 1
- 2 wie oben S.85
- 3 wie oben S.93
- 4 wie oben S.98-105
- 5 Hasek, M. and Nouza K.
Host and graft factors in homing of haemopoietic cells,
XIII. International Congress of Hematology 1970
- 6 Ford C.E., Micklem H.S., Evans E.D., Gray J.G. and Ogden D.A.
The inflow of bone marrow cells to the thymus: studies
with part body x-irradiated mice injected with chromo-
some-marked bone marrow and subjected to antigenic
stimulation.
Ann. N. Y. Acad. Sci. 129 : 283-296, 1966
- 7 Levey R.H. and Medawar P.B.
Nature and mode of action of ALS
Proc. Nat. Acad. Sci. US 56 : 1130, 1966
- 8 Ford C.E., Hamerton J.L., Barnes D.W.H. and Loutit J.F.
Cytological identification of radiation chimeras
Nature 177 : 452-454, 1956
- 9 Wachstein M. Alkaline phosphatase activity in normal and abnormal
human blood and bone marrow cells
J. Lab. Clin. Med. 31 : 1-17, 1946
- 10 Main J.M. and Prehn R.T.
Successful skin homografts after administration of high
dosage X-irradiation and homologous bone marrow
J. Nat. Cancer Inst. 15 : 1023-1029, 1955

- 11 Main J.M. and Prehn R.T.
Fate of skin homografts in X-irradiated mice treated
with homologous marrow
J.Nat.Cancer Inst.19 : 1853-1064, 1957
- 12 Monaco A.P., Abbott W.M. and Russell P.S.
Antilymphocyte serum and cell-free antigen loading
Transplantation Vol 7, No 4 : 291-293
- 13 Mitchison N.A. The colonisation of irradiated tissue by transplanted
spleen cells
Brit.J.Exp.Pathol.37 : 239-247, 1956
- 14 Van Bekkum D.W. and Vos O.
Immunological aspects of homo- and heterologous bone
marrow transplantation in irradiated animals
J.Cell.Comp.Physiol.50 : 139-156, 1957
- 15 Gorer P. and Boyse E.
Pathological changes in F_1 -hybrid mice following trans-
plantation of spleen cells from donors of the parental
strain.
Immunology 2 : 182, 1959
- 16 Van Bekkum D.W. and De Vries M.J.
In "Radiation chimera"
Logos press lim. 1967, S.130
Academic press inc. London lim. Berkley Square House
Berkley Square London W 1
- 17 Thierfelder S., Götze D., Eulitz M.
Die Wirkung von Kaninchen-anti-Maus-Lymphocyten-
 γ -Globulin auf die chronische Sekundärkrankheit bei
gegen Kaninchen-Normal- γ -Globulin toleranten Kno-
chenmarkspendern.
in Vorbereitung
- 18 Dresser D.W. Specific inhibition of antibody production
II Paralysis induced in adult mice by small quantities
of protein antigen.
Immunology 5 : 378, 1962

- 19 Gorer P.A. and Boyse E.A.
Some reactions observed with transplanted reticuloendothelial cells in mice.
In Biological problems of grafting
Ed. F.Albert and G.Lejeune-Ledant
Oxford, Blackwell, 193-204, 1959
- 20 Aisenberg A.C. Studies on cyclophosphamid induced tolerance to sheep erythrocytes
J.Exp.Med.835-845, 1967
- 21 Thomas E.D., Storb R. and Epstein R.B.
Bone marrow chimeras in man and animals
XIII,International Congress of Hematology, 1970
- 22 Miller, J. and Mitchell G.F.
Cell to cell interaction in the immune response
Transplantation Proc.1 : 535-538, 1969
- 25 Simonsen M. and Jensen E.
The graft versus host assay in transplantation chimeras.
In "Biological problems of grafting"
Ed. F.Albert and G.Lejeune-Ledant
Oxford, Blackwell, 214-236, 1959
- 24 Fox, M.
Cytological estimation of proliferating donor cells during graft-versus-host disease in F_1 -hybrid mice injected with parental spleen cells.
Immunology 5 : 489, 1962
- 25 Harris T.N., Harris S., Beale H.D. and Smith J.J.
Studies on the transfer of lymph node cells
IV Effects of X-irradiation of recipient rabbits on the appearance of antibody after cell transfer
J.Exp.Med.100 : 289-300, 1954
- 26 Lapp W.S. and Möller G.
Prolonged survival of H_2 -inkompatibile skin allografts on F_1 -animals treated with parental lymphoid cells.
Immunology 17 : 339, 1969

- 27 Zaalberg B.O., Vos O. and Van Bekkum D.W.
Surviving rat skin grafts in mice
Nature Aug.3 Vol.180, 1957
- 28 Dresser D.W. and Mitchison N.A.
The mechanism of immunological paralysis.
Advances in Immunology 8 : 129, 1968

Herrn Priv.-Doz.Dr.Thierfelder möchte ich
für die Überlassung des Themas und
Herrn Prof.Dr.W.Stich für den Arbeitsplatz
danken.

LEBENS LAUF

- 11.4.1944 geboren als Sohn des Arztes Dr.med.Heinz Kolb und der Ärztin Dr.med.Hildegard Kolb, geborene Keller.
- 1950 - 1954 Besuch der Volksschule in Hassloch/Pfalz.
- 1954 - 1963 Besuch des Staatlichen Altsprachlichen Gymnasiums in Neustadt/Weinstr.
- 2.3.1963 Reifeprüfung
- 1963 - 1965 Vorklinisches Medizinstudium an der Universität Freiburg/Breisgau
- 27.10.1965 Physikum, Note gut
- 1965/1966 Klinisches Medizinstudium an Universitäten Innsbruck, Wien und Freiburg
- 1967 - 1968 Klinisches Medizinstudium an Universität München
- 14.2.1969 Staatsexamen, Note sehr gut.
- April 1969 - August 1970 Arbeit in der Abteilung für Immunologie im Institut für Hämatologie der Gesellschaft für Strahlenforschung Neuherberg.
Dabei Doktorarbeit.
- v. November 1969 als Medizinal-Assistent in 1.Medizinischer Universitätsklinik München.
- b. April 1970
- v. August 1970 als Medizinal-Assistent in der Chirurgischen Klinik des Klinikums rechts der Isar in München.
- b. Dezember 1970
- 11.Februar 1970 Examen des ECFMG.

